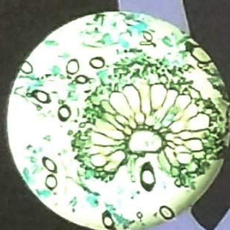
۲۰۲۱

مورای

میکروب شناسی پزشکی

باکتری شناسی

عمومی / اختصاصی




ترجمه:
دکتر جلال مردانه
دانشیار میکروب‌شناسی پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی گناباد



MBS
Medical Basic Science







زندگی صحنه یکتای هنرمندی ماست

هر کسی نغمه خود خواند و از صحنه رود

صحنه پیوسته به جاست

خرم آن نغمه که مردم بسپارند به یاد



سرشناسه : موری، پاتریک آر.
Murray, Patrick R.
عنوان و نام پدیدآور : میکروب‌شناسی پزشکی موری: باکتری‌شناسی عمومی اختصاصی/ مولف پاتریک‌آر. موری، [کن‌اس. روزنتال، مایکل‌ا. فالر] ؛ مترجم جلال مردانه.
مشخصات نشر : تهران: اندیشه رفیع، ۱۳۹۹.
مشخصات ظاهری : ۵۸۰ ص.
شابک : 978-622-273032-1 :
وضعیت فهرست نویسی : فیپا
یادداشت : عنوان اصلی: .Medical microbiology,9th ed,2021
یادداشت : عنوان دیگر: میکروب‌شناسی پزشکی موری: (باکتری‌شناسی عمومی اختصاصی) ۲۰۲۱.
موضوع : میکرب‌شناسی پزشکی
موضوع : Medical microbiology
موضوع : باکتری‌شناسی پزشکی
موضوع : Medical bacteriology
شناسه افزوده : روزنتال، کن اس.
شناسه افزوده : Rosenthal, Ken S.
شناسه افزوده : فالر، مایکل ا.، ۱۹۵۰ - م.
شناسه افزوده : Pfaller, Michael A.
شناسه افزوده : مردانه، جلال، ۱۳۵۸ -، مترجم
رده بندی کنگره : QR۴۶
رده بندی دیویی : ۶۱۶/۹۰۴۱
شماره کتابشناسی ملی : ۷۴۰۴۳۹۳
وضعیت رکورد : فیپا



اندیشه رفیع

ناشر کتب علوم پزشکی

www.andisherafi.com

نام کتاب: میکروب شناسی پزشکی موری (باکتری شناسی عمومی - اختصاصی) ۲۰۲۱

مولف: پاتریک آر. موری

مترجم: دکتر جلال مردانه

ناشر: انتشارات اندیشه رفیع

گرافیک متن: شادی حمیدی

نوبت چاپ: اول - ۱۳۹۹

شمارگان: ۲۰۰۰ جلد

لیتوگرافی: ندای دانش

چاپ: منصور

شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۲۷۳-۰۳۲-۱

بها: ۱۵۰۰۰۰ تومان

دفتر مرکزی: **اندیشه رفیع**
خیابان انقلاب - خیابان ۱۲ فروردین - خیابان شهدای ژاندارمری
مقابل اداره پست - ساختمان ۱۲۶ - طبقه‌دوم - تلفکس: ۶۶۹۵۰۳۹۳
تلفن: ۶۶۹۷۱۴۱۴ - ۶۶۹۷۰۵۱۷ - ۶۶۹۷۰۵۱۸

مقدمه مترجم

به نام خداوند یکتا

سرآغاز سخن یزدان پاک و مهربان را بسیار سپاسگزارم که من را یاری نمود تا با ترجمه مجموعه پیش رو کمکی در جهت افزایش دانش این سرزمین رسانده باشم. بی‌شک میکروب‌شناسی علمی بسیار گسترده بوده که از اهمیت ویژه‌ای در بین علوم مختلف از جمله پزشکی، بیوتکنولوژی، مهندسی ژنتیک، نانوتکنولوژی، همچنین صنعت و سایر علوم برخوردار می‌باشد و هر روز با آشکار شدن بخشی از ناگفته‌های فراوانی که در این رشته وجود دارد ارزش آن نمایان‌تر می‌گردد.

کتاب پیش رو ترجمه قسمت باکتری‌شناسی (عمومی و اختصاصی) آخرین چاپ (ویرایش ۲۰۲۱) کتاب میکروب شناسی پزشکی مورای می‌باشد. کتاب مرجع میکروب‌شناسی پزشکی مورای هر ۴ سال یکبار تجدید چاپ می‌گردد و در هر چاپ جدید، نویسنده سعی بر آن دارد که جدیدترین و ضروری‌ترین مطالب را در این زمینه اضافه نماید. در چاپ ۲۰۲۱ این کتاب در بخش‌های مختلف مطالب جدیدی در خصوص طبقه‌بندی باکتری‌ها، فاکتورهای بیماریزایی، روش‌های تشخیص و رژیم‌های درمانی اضافه گردیده است. در این چاپ با شیوه‌ای متفاوت از چاپ‌های قبل، نویسنده به منظور درک بهتر خوانندگان از باکتری‌ها و بیماری‌های عفونی ناشی از آنها، به معرفی موارد بالینی و طرح پرسش و پاسخ در ابتدا و انتهای فصل‌های کتاب پرداخته است. علاوه بر این کتاب حاضر از نظر ساختاری و ترتیب قرار گیری فصل‌ها نیز متفاوت از چاپ قبلی است که به فهم بهتر مطالب کمک می‌کند.

این کتاب از سوی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به عنوان مرجعی جهت تدریس در دانشگاه‌ها برای گروه‌های مختلف پزشکی، علوم پایه پزشکی و نیز آزمون‌های رشته‌های گوناگون در مقاطع مختلف تحصیلی شامل دکتری تخصصی (Ph.D)، کارشناسی ارشد، کارشناسی و ارتقاء که درس میکروب‌شناسی پزشکی از دروس امتحانی آنها می‌باشد، معرفی شده است.

در طی ترجمه این کتاب تمام تلاش بر این بوده است که با رعایت کامل امانت‌داری در ترجمه، مجموعه‌ای کامل و جامع را به خوانندگان گرامی تقدیم نمایم، با این وجود، کتاب پیش رو خالی از اشکال نبوده و از خوانندگان و دانشجویان گرامی خواستارم که دیدگاه‌های خود را ارائه نموده تا در ویرایش‌های بعدی این کتاب مورد استفاده قرار گیرد.

در پایان از تلاش‌های فراوان مدیر مسئول انتشارات اندیشه رفیع جناب آقای رنجبر، و دیگر دست‌اندرکاران این موسسه و تمام کسانی که در ترجمه و چاپ این کتاب ما را یاری رسانده‌اند، بسیار سپاسگزارم.

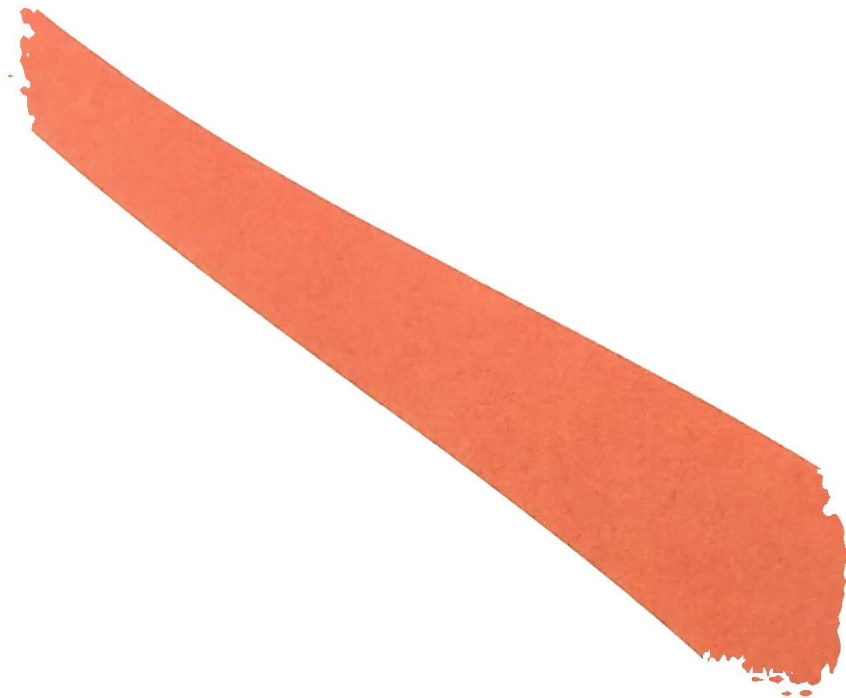
جلال مردانه

تابستان ۱۳۹۹

Email: Jalalmardaneh@yahoo.com

تقدیم به

این کتاب را پیشکش می‌نمایم به همسر مهربان و فرزنـــدان عزیزم آریا و پوریا که وجودشـــان شادی‌بخش زندگی من است.



فهرست

بخش ۱

مقدمه

فصل ۱

مقدمه‌ای بر میکروب‌شناسی پزشکی

احساس جالب آنتون وان لیون هوک (Anton van Leeuwenhoek)، بیولوژیست هلندی، در سال ۱۶۷۴ را تصور کنید، زمانی که او طی بررسی‌های دقیق از طریق عدسی‌های میکروسکوپی روی یک قطره آب، دنیایی از میلیون‌ها جاندار کوچک (Animalcules) را کشف کرد. حدود ۱۰۰ سال بعد یک بیولوژیست دانمارکی به نام اتومولر (Otto Muller) مطالعات وان لیون هوک را گسترش داد و باکتری‌ها را براساس روش‌های طبقه‌بندی کارلوس لینئوس (Carolus Linnaeus) در جنس‌ها و گونه‌ها طبقه‌بندی کرد. این آغاز طبقه‌بندی تاکسونومیک میکروب‌ها بود. در سال ۱۸۴۰ یک پاتولوژیست آلمانی به نام فردریش هنله (Friedrich Henle) یک سری معیارهایی جهت اثبات نقش میکروارگانیسم‌ها به عنوان عوامل بیماری‌های انسانی (تئوری جرم (Germ Theory) در مورد بیماری‌ها) مطرح نمود. روبرت کخ (Robert Koch) و لویی پاستور (Louis Pateur) در طی دهه های ۱۸۷۰ و ۱۸۸۰ این تئوری را تأیید کردند و به کمک یک سری آزمایشات متوالی ثابت کردند که میکروارگانیسم‌ها مسئول ایجاد بیماری‌هایی مانند سیاه زخم، هاری، طاعون، وبا و سل هستند. دیگر دانشمندان نیز ثابت کردند که مجموعه متنوعی از میکروب‌های مختلف مسئول ایجاد بیماری در انسان هستند. دوره شیمی درمانی (Chemotherapy) در سال ۱۹۱۰ زمانی آغاز گردید که یک شیمیدان آلمانی به نام پل ارلیش (Paul Erlich) اولین عامل ضد میکروبی یعنی ترکیبی که علیه اسپیروکت‌های عامل سفلیس مؤثر بود را کشف کرد. بعد از آن پنی‌سیلین (Penicillin) در سال ۱۹۲۸ توسط الکساندر فلمینگ (Alexander Fleming's)، سولفانیل آمید (Sulfanilamide) در سال ۱۹۳۵ توسط جرالد دوماک (Gerhard Domagk's)، استرپتومایسین (Streptomycin) در سال ۱۹۴۳ توسط سلمن واکسمن (Selman Waksman's) کشف شد. در سال ۱۹۴۶ یک میکروب‌شناس آمریکایی به نام جان اندرز (John Enders) اولین کسی بود که ویروس‌ها را در کشت‌های سلولی کشت داد که منجر به ایجاد راهی برای تولید زیاد کشت‌های ویروسی جهت توسعه واکسن (Vaccine) شد. هزاران دانشمند این مسیر را دنبال کردند که هر کدام روش خاص خود را داشتند و هر کدام روش‌هایی را برای شناخت میکروب‌ها و نقش آن‌ها در بیماریزایی ارائه نمودند.

دانش و تجربه میکروب‌شناسی ما هم‌اکنون یک تحول قابل توجه یافت‌شده در پیشرفت‌های تکنولوژیک سریع در آنالیز ژنوم را تجربه می‌کند. تست‌های تشخیصی ملکولی پیاده سازی شده‌اند و به اندازه کافی ارزان هستند که امکان شناسایی سریع و تایید ارگانیسم‌ها را فراهم سازند. قبلاً حقایق غیرقابل درک در خصوص خصوصیات بیماریزایی ارگانیسم‌ها، ارتباطات تاکسونومیک و ویژگی‌های عملکردی جمعیت میکروبی درون‌زا آشکار شده است. پیچیدگی‌های علم میکروب‌شناسی پزشکی در عصر امروز بیش از گذشته خود نمایی می‌کند. ما امروزه می‌دانیم که هزاران نوع مختلف از میکروب‌ها در درون، بیرون و اطراف ما زندگی می‌کنند و صدها نوع آن عامل بیماری‌های جدی در انسان هستند. برای درک این اطلاعات و طبقه‌بندی آن‌ها به صورت کارآمد، باید یک سری مسائل پایه و اساسی میکروب‌شناسی پزشکی را بدانیم. برای این منظور میکروب‌ها را می‌توان به ۵ گروه کلی دسته‌بندی کرد: ویروس‌ها، باکتری‌ها، آرکئا باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها، که هر کدام پیچیدگی خاص خود را دارند. به نظر نمی‌رسد که آرکئا باکتری‌ها باعث ایجاد بیماری شوند

اما بندپایان ممکن است رابطه ایجاد بیماری با انسان داشته باشند و در این کتاب مورد بحث قرار می‌گیرند.

ویروس‌ها

ویروس‌ها (Viruses) کوچکترین ذرات عفونی هستند و محدوده قطر این ذرات از ۱۸ تا ۶۰۰ نانومتر است (اغلب ویروس‌ها کمتر از ۲۰۰ نانومتر هستند و نمی‌توانِ آن‌ها را با میکروسکوپ نوری دید). ویروس‌ها معمولاً حاوی دئوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) یا ریبونوکلئیک اسید (RNA) هستند ولی هر دو آن‌ها در یک ذره وجود ندارد، با این حال ذراتی وجود دارند که مشابه ویروس‌ها هستند ولی فاقد هرگونه اسیدهای نوکلئیک قابل شناسایی می‌باشند (مانند پریون‌ها) با این وجود اخیراً یک ذره به نام میمی ویروس (Mimivirus) شناسایی شده است که حاوی DNA و RNA است. اسیدهای نوکلئیک ویروسی که برای همانند سازی ضروری‌اند در یک پوشش پروتئینی همراه با یک غشاء لیپیدی یا بدون آن بسته‌بندی شده‌اند. ویروس‌ها، انگل‌های واقعی هستند و برای همانندسازی به سلول‌های میزبان نیاز دارند. نوع سلول‌هایی که با ویروس آلوده می‌شوند و پاسخ ایمنی میزبان به عفونت، نوع علایم کلینیکی بیماری را مشخص می‌کند. تاکنون بیش از ۲۰۰۰ گونه ویروس شناسایی شده که تقریبا ۶۵۰ گونه آن برای انسان‌ها و حیوانات عفونی هستند. عفونت می‌تواند به صورت همانندسازی سریع ویروس‌ها و تخریب سلول باشد یا به صورت یک رابطه طولانی مدت مزمن، و در صورت امکان ادغام اطلاعات ژنتیکی ویروسی در ژنوم میزبان باشد. فاکتورهایی که مشخص می‌کند کدام یک از این مکانیسم‌ها رخ دهد به صورت جزیی شناسایی شده‌اند.

طیف بیماری‌های ایجاد شده توسط ویروس‌ها می‌تواند از یک سرماخوردگی معمولی تا یک عفونت معده‌ای - روده‌ای تا بیماری‌های کشنده مانند ابولا و با تظاهرات حاد، مزمن و حتی تحریک کننده ایجاد سرطان باشد. پاسخ ایمنی هم محافظت و هم پاتولوژی را سبب می‌باشد و می‌تواند عامل اولیه بیماری باشد و اغلب با علائم شبه آنفولانزا غیر اختصاصی ناشی از پاسخ‌های میزبان به حضور ویروس در خون آغاز می‌شود. بیماری ویروسی به وسیله بافت‌های هدف آلوده شده توسط ویروس مشخص می‌شود. تشخیص سایتومگالوویروس کلاسیک با جداسازی در کشت سلول، شناسایی اجزا ویروسی یا پاسخ‌های ایمنی ضدویروسی با نقش مرکزی برای شناسایی ژنتیکی و توالی‌یابی، صورت می‌یرد. درمان توسعه پیدا کرده است بطوریکه هم اکنون درمان قابل قبولی برای عفونت‌های ویروس هپاتیت C و پایداری مادام العمر ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) وجود دارد. واکسن‌های جدید خطر ناشی از چندین ویروس را کاهش داده و واکسن‌های مورداستفاده جهت ویروس پاپیلومای انسانی و هپاتیت B از سرطان‌ها نیز جلوگیری می‌کنند.

باکتری‌ها

باکتری‌ها (Bacteria) از نظر ساختمانی نسبتا ساده هستند. آن‌ها پروکاریوت هستند. ارگانیسم‌های تک سلولی ساده بدون غشاء هسته (Nuclear Membrane)، میتوکندری (Mitochondria)، اجسام گلژی (Golgi Bodies) و شبکه اندوپلاسمی (Endoplasmic Reticulum) که با تقسیم غیر جنسی (Asexual Division) تکثیر می‌یابند. دیواره سلولی باکتری‌ها پیچیده است و شامل یکی از دو شکل اصلی می‌باشد: یک دیواره سلولی گرم مثبت با یک پپتیدوگلیکان ضخیم و یا یک دیواره سلولی گرم منفی با یک لایه پپتیدوگلیکان نازک و یک غشاء خارجی. بعضی از باکتری‌ها فاقد این ساختار سلولی هستند و فقط در سلول‌های میزبانی یا در محیط هایپرتونیک می‌توانند زنده بمانند. اندازه (۱ تا ۲۰ میکرومتر یا بیشتر)، شکل (کروی، میله‌ای، فنری) و آرایش فضایی سلول‌ها (سلول‌های تک، زنجیره‌ها، دسته‌ها) برای طبقه‌بندی اولیه باکتری‌ها بکار می‌رود و خصوصیات فنوتیپک و ژنوتیپیک باکتری‌ها اساس طبقه‌بندی قطعی آن‌ها می‌باشد.

ما در جهان میکروبی با میکروب‌ها زندگی می‌کنیم بطوریکه در هوایی که تنفس می‌کنیم، آبی که می‌نوشیم و غذایی که می‌خوریم نیز باکتری‌ها وجود دارند. خیلی از این باکتری‌ها غیر بیماریزا هستند ولی بعضی از آن‌ها می‌توانند بیماری‌های مرگ‌آور ایجاد کنند. بدن انسان

یک زیستگاه برای هزاران گونه باکتریایی مختلف است. بعضی از آن‌ها به صورت موقت آن جا زندگی می‌کنند و برخی به صورت دائمی یک رابطه انگلی با میزبان خود دارند. این جمعیت میکروب‌های ساکن در روده‌ها روی پوست‌ها و سایر سطوح اپی‌تلیال (تحت عنوان میکروبیوم انسان نامیده می‌شود) تقریبا به عنوان یک ارگان بدن عمل می‌کند. هر کدام از ما میکروبیوم منحصر بفردی را داریم که همانند اثر انگشت دارای شناخت‌هایی است. اما تفاوت‌های فردی دارد. اگرچه میکربیوم تحت‌تأثیر ژنتیک‌های می‌باشد و توسط سیستم ایمنی ما کنترل می‌شود، اما میکروبیوم به محیط، رژیم غذایی‌ها، و آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر داروهایی که ما استفاده می‌کنیم حساس است همان طور که روش‌های آنالیز ژنتیکی سریع‌تر و ارزان‌تر می‌باشند اما اثرات انواع مختلف میکروب‌های موجود در میکروبیوم روی سیستم ایمنی ما، متابولیسم، متابولیسم دارویی، رفتار و سلامتی عمومی ناشناخته هستند. در آینده‌ای نزدیک ما شاهد افزایش استفاده از میکروبیوم روده‌ای با هدف درمانی با روش پیوند مدفوعی به عنوان درمان حاضر کولیت عود کننده کلستریدیوم دینیسیل در جهت درمان بیماری التهابی روده، دیابت تیپ ۲ مرتبط با سندرم متابولیک و سایر بیماری‌ها خواهیم بود.

بیماری باکتریایی می‌تواند نتیجه اثرات سمی محصولات باکتریایی (مثلاً توکسین‌ها) یا وقتی باکتری‌ها به بافت‌ها و مایعات بدن که به طور طبیعی استریل هستند حمله می‌کنند باشد. برخی باکتری‌ها همیشه بیماریزا هستند، فاکتورهای بیماریزایی بیان می‌کنند که سبب آسیب بافتی می‌شود، در حالی که دیگران از طریق تحریک التهاب سبب بیماری شده و یا بسیاری از باکتری‌ها از هر دو روش استفاده می‌کنند. شناسایی مناسب باکتری‌های ایجاد کننده عفونت امکان پیش‌بینی دوره بیماری و درمان چند میکروبی مناسب را فراهم می‌سازد. متاسفانه استفاده نامناسب از آنتی میکروب‌ها و سایر فاکتورها منجر به انتخاب باکتری‌های مقاوم به چندین ماده ضد میکروبی می‌گردد که قابل درمان نیستند.

قارچ‌ها

برعکس باکتری‌ها، ساختار قارچ‌ها (Fungi) بسیار پیچیده است. قارچ‌ها ارگانیسم‌های یوکاریوت هستند که دارای هسته مشخص، میتوکندری، دستگاه گلژی و شبکه اندوپلاسمی هستند. قارچ‌ها می‌توانند یا به صورت تک سلولی (مخمر) باشد که دارای تکثیر غیر جنسی هستند یا به صورت رشته‌ای (کپک) باشند که دارای تکثیر غیر جنسی و جنسی می‌باشند. اغلب قارچ‌ها یا به صورت مخمر یا به صورت کپک هستند، هرچند بعضی از قارچ‌ها می‌تواند به هر دو شکل وجود داشته باشد که این‌ها به عنوان قارچ‌های دو شکلی محسوب می‌شوند و شامل ارگانیسم‌هایی مانند *هیستوپلاسما*، *بلاستومایسس* و *کوکسیدیوئیدس* می‌باشد.

عفونت‌های قارچی از عفونت‌های پوستی خوش خیم تا پنومونی تهدید کننده زندگی، سپسیس و بیماری‌های ایجاد کننده اختلالات شکلی متغیر هستند. اغلب قارچ‌ها به‌طور موثری توسط ایمنی میزبان کنترل می‌شوند و می‌تواند در بدن فرد برای تمام عمر باقی بماند اما این قارچ‌های مشابه می‌توانند سبب بیماری شدید در میزبان دارای ضعف سیستم ایمنی شود. درمان ضد میکروبی فرایندهای متابولیکی منحصر به فرد و ساختارهای قارچ‌های هدف قرار می‌دهند اما ممکن است توکسیک بوده و نیاز به درمان‌های طولانی‌مدت باشد. همانند باکتری‌ها، استفاده گسترده از عوامل ضد قارچی در بخش‌های بیمارستانی منجر به ظهور مخمرها و قارچ‌هایی می‌شود که مقاومت ذاتی یا اکتسابی را به چندین کلاس مختلف عوامل ضد قارچی را نشان می‌دهند.

انگل‌ها

انگل‌ها (Parasites) پیچیده‌ترین میکروب‌ها هستند. اگرچه همه انگل‌ها به عنوان یوکاریوت طبقه‌بندی شده‌اند، بعضی از آن‌ها تک سلولی‌اند و بعضی دیگر چند سلولی هستند. محدوده اندازه انگل‌ها می‌تواند از پروتوزآهای ریز به قطر ۴ تا ۵ میکرومتر (همانند اندازه

اغلب باکتری‌ها) تا کرم‌های نواری به طول ۱۰ متر و آرتروپودها (مانند ساس‌ها) باشد. در حقیقت، تصور اندازه بعضی از انگل‌ها و طبقه‌بندی آن‌ها جزء میکروب‌ها دشوار است. چرخه‌های زندگی آن‌ها نیز همواره پیچیده هستند. بعضی از انگل‌ها یک رابطه دائمی با انسان‌ها دارند و بقیه در طی مراحل تکامل در رابطه با میزبان‌های حیوانی هستند. بیماری انگلی از طریق علائم، کسب تاریخچه خوب از بیمار و شناسایی میکروب، شناسایی می‌شود. نکات مفید از تاریخچه سفر و رژیم غذایی بیمار به دست می‌آید زیرا بسیاری از انگل‌ها منحصر به نواحی مختلف جهان می‌باشند. درمان برای برخی از انگل‌ها و نه همه آن‌ها وجود دارد و گسترش مقاومت به عوامل ضد انگلی پیشگیری و درمان بسیاری از عفونت‌های ایجاد شونده توسط انگل‌ها را پیچیده می‌کند.

ایمونولوژی

بحث کردن در مورد میکروب‌شناسی انسانی بدون شناخت پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی در برابر میکروب‌ها امری دشوار است. پاسخ‌های ذاتی و ایمنی با جهت نگهداری میکروبیوم فلور نرمال ما و محافظت ما در برابر عفونت ناشی از پاتوژن‌ها برنامه‌ریزی شده‌اند. سدهای فیزیکی از تهاجم میکروب جلوگیری می‌کند، پاسخ‌های ذاتی الگوهای مولکولی را روی ترکیبات میکروبی شناسایی کرده و دفاع‌های موضعی را فعال می‌نمایند و پاسخ‌های ایمنی آداپته شده اختصاصی میکروب‌های مهاجم را به منظور حذف و مهار توکسین‌های آن‌ها هدف قرار می‌دهند. متاسفانه، پاسخ ایمنی اغلب بسیار با تاخیر یا خیلی آهسته بوده تا بتواند از عفونت جلوگیری کرده یا گسترش آن را مانع شود. پاسخ التهابی ایجاد شده اغلب در ایجاد علائم بیماری مشارکت داشته یا عامل با آن‌ها می‌باشد برای بهینه‌سازی ایمنی‌سازی فعال با ترکیبات میکروب‌ها (واکسن‌ها) تقویت می‌شود. سرانجام پاسخ‌های ذاتی و ایمنی بهترین جلوگیری کنندگان و درمان بیماری میکروبی هستند.

بیماری میکروبی

آزمایشگاه میکروب‌شناسی بالینی نقش مهمی را در تشخیص و کنترل بیماری‌های عمومی بازی می‌کند. تکنولوژی‌های ملکولی، پروتئومیک و ایمونولوژیک جدیدتر جهت افزایش اطلاعاتی که آزمایشگاه می‌تواند فراهم سازد مورد استفاده قرار می‌گیرند.

بسیاری از تست‌های تشخیصی نیاز به نمونه‌های زنده داشته و کیفیت نتایج به کیفیت نمونه جمع‌آوری شده از بیمار، روش‌هایی که به وسیله آن‌ها نمونه از بیمار گرفته شده و به آزمایشگاه انتقال داده می‌شود، و تکنیک‌هایی که برای نشان دادن میکروب در نمونه استفاده می‌گردند، دارد علاوه بر این نمونه جمع آوری شده باید نمایشگر محل عفونت باشد و در طی جمع‌آوری نباید با سایر ارگانیسم‌های کلونیزه کننده پوست و سطوح مخاطی آلوده شود. تعیین کننده‌های حساسیت ضد میکروبی نیاز به میکروب‌های زنده و نمایشگر خالص شده از نمونه بالینی دارند. دانستن حداقل غلظت‌های مهارکنندگی و بیوسیدال برای داروهای خاص جهت تجویز بهترین درمان مهم می‌باشد.

روش‌های آنالیز ژنوم و آنتی‌ژن کمتر گران بوده و برای اغلب پاتوژن‌ها در دسترس می‌باشد. این روش‌ها ممکن است نیاز به نمونه‌های زنده نداشته باشند. این آزمایش‌ها بسیار حساس و اختصاصی بوده و می‌توانند سرعت آنالیز را بالا ببرند.

میکروبیولوژی و ایمونولوژی در کلینیک

نسبتا تعداد کمی از ارگانیسم‌ها به عنوان همیشه بیماری‌زا (مانند ویروس هاری، باسیلوس آنتراسیس، شیگلا، اسپوروتریکس) دسته‌بندی می‌شوند درحالی که برخی تنها شرایط به خوبی تعریف شده یا تحت شرایط خاص (مثلاً عفونت‌های فرصت طلب افراد دارای ضعف سیستم ایمنی) باعث ایجاد بیماری می‌شوند. برخی بیماری‌ها وقتی که شخصی در معرض ارگانیسم‌ها از منابع خارجی است ایجاد می‌شوند که تحت عفونت اگزوجنوس نامیده می‌شود (مانند ویروس آنفلوآنزا، کلستریدیوم تتانی، نایسریا گونوره، کوکسیدیوایدیس

کادر ۱-۱ چهار سوال راجع به بیمار مبتلا به بیماری عفونی

۱-آیا یک عفونت است؟
۲- عفونت کجاست؟
۳- کدام میکروب ایجاد کننده عفونت بوده و چگونه باعث ایجاد بیماری می‌شود؟
۴- آیا بیماری باید درمان شود و اگر چنین است بهترین درمان کدام است؟

ایمیتیس و آنتاموباهیستولیتیکا)، اما اغلب بیماری‌های انسان توسط ارگانیسم‌هایی از فلور میکروبی خود فرد که به قسمت‌های به طور نرمال استریل بدن (مانند خون، مغز، ریه‌ها، حفره صفاقی) گسترش یافته‌اند که به دنبال آن بیماری اتفاق می‌افتد (عفونت‌های اندوجنوس). برخی عفونت‌ها سبب ایجاد یک بیماری به خوبی شناخته شده منفرد می‌گردند که در اغلب مواقع توسط فعالیت فاکتور بیماری‌زا از قبیل توکسین (مثلا کلستریدیوم تتانی [کزاز] ایجاد می‌شود در حالی که دیگران می‌توانند سبب تظاهرات متعدد بیماری شوند (مثلا استافیلوکوکوس اورئوس) سبب ایجاد اندوکاردیت، پنومونی، عفونت‌های زخم مسمومیت غذایی می‌شود). بیماری مشابهی می‌تواند هم چنین توسط میکروب‌های مختلفی ایجاد شود (مثلاً مننژیت می‌تواند توسط ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها ایجاد شود).

از طریق درک ویژگی‌های میکروب و پاسخ میزبان به عفونت یک رویکرد شبه شرلوک هولمز می‌تواند برای شرارت میکروبی به کار گرفته شود تا بیماری عفونی بالینی بیمار بر طرف گردد. علاوه بر این احتیاطات مناسب برای محافظت خود فرد و دیگران از عفونت می‌تواند اتخاذ گردد و رویکرد قابل درک برای تجویز درمان مناسب می‌تواند طراحی شود. وقتی با یک بیمار با بیماری عفونی مواجهه هستیم چهار سئوال وجود دارد که باید پاسخ داده شوند (کادر ۱-۱).

پرسش ۱: اولین قدم در درمان بیماری عفونی شناسایی و افتراق عفونت از سایر بیماری‌ها است. عفونت‌ها اغلب همراه با تب، التهاب، تورم غدد لنفاوی و سایر علائم هستند (جدول ۱-۱). بسیاری از این تظاهرات بیماری در نتیجه پاسخ التهابی به عفونت ایجاد می‌شوند. این تظاهرات مشابه می‌تواند توسط سایر سندروم‌های

جدول ۱-۱ نشانه‌های یک عفونت

- تب
- بالا بودن تعداد نوتروفیل
- پنومونی
- اسهال
- راش
- آبسه
- علائم شبه آنفلوآنزا
- لرز
- لنفو آدنوپاتی
- بزرگ شدن طحال یا کبد
- از دست دادن وزن به صورت غیر قابل وتوجیه
- گلودرد
- itises
- سپسیس
- مفصل داغ

بیماری ایجاد شوند.

پرسش بعدی این است که عفونت کجاست؟ دانستن محل عفونت می‌تواند نشانه‌هایی در خصوص میکروب احتمالی ایجاد کننده عفونت فراهم سازد و در انتخاب آنتی میکروبیالی که بتواند به بافت یا محل عفونی شده برسد اهمیت دارد.

پاسخ‌ها به پرسش ۳ اهداف اصلی این کتاب هستند: کدام میکروب ایجاد کننده عفونت بوده و چگونه باعث بیماری شده است؟ اگرچه افتراق عفونت‌های باکتریایی، ویروسی، قارچی و انگلی در اغلب موارد از طریق تظاهرات فیزیکی و تاریخچه بیمار امکان‌پذیر است اما برخی از تست‌های آزمایشگاهی می‌تواند به تمرکز بر روی تشخیص کمک نمایند. برای مثال عفونت‌های باکتریایی اغلب همراه با افزایش سطوح سرمی پروتئین واکنشی C و پروکلسی تونین هستند که اجزاء یک پاسخ التهابی می‌باشند. زمانی که تشخیص افتراقی حاصل می‌شود (لیستی از میکروب‌های احتمالی)، سپس تست‌های تاییدی می‌توانند میکروب ایجاد کننده بیماری را شناسایی نمایند. فصل ۴ تا ۶ انواع تست‌های مختلف ارایه شده و کاربرد آن‌ها برای هر میکروب مورد بحث قرار می‌گیرد. علاوه بر دانستن مناسب‌ترین تست برای میکروب یا سندروم میکروبی، دانستن محدودیت‌ها، حساسیت و اختصاصیت تست‌ها نیز مهم است.

افراد بیشتر و بیشـتری با نقص‌های ایمنی ناشی از درمان‌های مورد اسـتفاده برای سـرطان، بیماری خود ایمنی، یا عفونت‌ها (مثـلا AIDS) زندگی می‌کنند. این افراد به عفونت‌های ایجاد شده توسط میکروب‌های کمتر بیماریزا یا غیر بیماریزا حسـاس می‌باشند در صورتی که افراد دیگر را درگیر نمی‌کند. اهمیت پاسـخ ایمنی ناقص برای محافظت علیه این میکروب‌ها بسیار واضح است.

بیمـاری باکتریایـی معمـولا توسـط فاکتورهای بیماریزای میکروب تعیین می‌شـود. بـرای برخی یک فاکتور بیماریزا عامل بیماری می‌باشـد مثلا برای کورینه باکتریوم دیفتریه، ویبریوکلرا و کلستریدیوم بوتولینوم تولید کننده توکسـین، برای دیگران بیماری ممکن اسـت در نتیجه کلونیزاسیون، محصولات جانبی سم یا پاسخ‌های ایمنی و التهابی به میکروب باشـد. پاسـخ‌های ایمنی و التهابی توسط سـاختارهای میکروب تحریک می‌شوند. ساختارهای میکروبی تکراری الگوهای ملکولی مرتبط با پاتوژن را فراهم می‌کنند که پاسـخ‌های ذاتی را تحریک می‌نمایند در حالی که سـاختارهای اختصاصی توسـط پاسخ ایمنی شناسایی می‌شوند. علاوه بر این ساختارهای باکتریایی و قارچی خارج سلولی معمولا فعال سازی آبشار پروتئین‌های قابل حل سیستم کمپلمان تحریک می‌کنند که ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها را به محل عفونت فراخوانی می‌نمایند، التهاب آغاز می‌شـود. تولیـد آنتی‌بادی فعال شـده و یک سوراخ غشـایی ملکولی در میکروب ایجاد می‌گردد. عفونت‌های داخل سـلولی شـامل ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها نیاز به پاسخ ایمنی مختلفی دارند و پیامدها نیز متفاوت هسـتند. سـلول‌های انسانی به وسـیله خاموش کردن فرایندهای سلولی و از طریق فعال کردن پاسـخ‌های سلولی سـایتولیتیک (پاسخ‌های سلول کشـنده طبیعی [NK]، سـلول T و ماکروفاژ) که سـلول‌های عفونی را کشـته و یا wall off می‌کنند به عفونت میکروبی داخل سلولی پاسخ می‌دهند. آنتی‌بادی تولید می‌شود تا توکسـین‌ها را غیر فعال کرده از اتصال میکروب جلوگیری نماید و برداشـت و حذف آن توسط ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها تسـهیل نماید. طبیعت بیماری و حساسیت یک فرد به پاتوژن با توجه به این که چگونه پاسخ محافظتی سریعا علیه عفونت عمل نماید، کارآمدی پاسـخ و پیامدهای ایمونوپاتولوژیک پاسـخ مشـخص می‌شـود. التهاب همراه اغلب پاسخ‌های ایمنی می‌باشد و گاهـی اوقات تنها درمان التهـاب به عنوان عاملی که برای درمان عفونت اسـت اهمیت دارد تا شدت بیماری کاهش یابد.

پرسش چهار باید مورد تفکر قابل توجهی قرار گیرد: آیا میکروب باید درمان شود و اگر چنین است بهترین درمان کدام است؟ طراحی درمان مناسب برای عفونت‌هایی که خود به خودی بهبود پیدا نمی‌کنند ضروری است. اگر چه درمان آنتی‌بیوتیکی می‌تواند سبب از بین رفتن فلور نرمال شـده که به دنبال آن باکتری‌ها و قارچ‌های بیماریزایی بیشتری اجازه پیدا می‌کنند در آن جا ساکن شوند. درمان مناسب نیاز به استفاده کافی از داروی ضد میکروبی علیه هدف حساس در داخل میکروب در محل عفونت در بدن، دارد. قدرت ضـد میکروبی و طیف فعالیت و خصوصیات فارماکولوژیک دارو به وسیله ساختار و روش فعالیت دارو مشخص می‌شود. میکروب‌ها ممکن است به طور طبیعی مقاوم بوده یـا جهش پیدا نمایند یـا اطلاعاتی ژنتیکی را کسـب نمایند تا خود را مقـاوم کنند و آن‌هایی که به آنتی بیوتیک‌ها مقاوم هسـتند انتخاب خواهند شد و دوام خواهند آورد. انتخاب‌هـای ضد میکروبی آغازین ممکن است تلاش داشـته باشند که همه پاتوژن‌های ممکن را پوشش دهند اما با شناسـایی میکروب و حساسیت‌های ضـد میکروبی آن، آنتی‌بیوتیک‌هایـی که اختصاصی‌تر، ارزان‌تـر، تجویز آن‌ها راحت‌تر و یـا دارای اثرات جانبی کمتری هسـتند باید تجویز شوند داروهای ضد میکروبی در فصل‌های ۱۷، ۴۰، ۶۱ و ۷۱ مورد بحث قرار گرفته‌اند.

علاوه بر چهار پرسـش مرتبط با بیمار، ارایه دهنده مراقبت نیز باید بداند که خود و دیگران را در برابر عفونت محافظت نماید. پرسـش‌های کلیدی شـامل این موارد می‌باشـند: آیا واکسن وجود دارد؟ چه مراقبت‌های ایمنی باید بکار برده شـود؟ چگونه می‌توان دست‌ها، وسایل و سـطوح آلوده را ضدعفونی کرد؟ بهترین روش محافظت از فرد در برابر عفونت جلوگیری از در معرض قرار گرفتن یا تماس است و سپس بهترین روش ایجاد ایمونیزاسیون علیه میکروب با عفونت قبلی یا واکسن است. روش‌های مناسـب رعایت بهداشـت و ضدعفونی در فصل ۳ مورد بحث قرار گرفته‌اند و واکسن‌ها در فصل ۱۱ بحث شده‌اند. محدود کردن دسترسـی به افراد یا محیط‌های آلوده به

وسیله قرنطینه به جلوگیری از گسترش ویروس آبله کمک کرد و با یک واکسن موثر و برنامه واکسیناسیون جهانی منجر به ریشه‌کنی ویروس شد.

دانستن ویژگی‌های اپیدمیولوژیک میکروب به تعیین مواجهه بالقوه و شناسایی این که چه کسی در خطر عفونت است کمک می‌کند. این شامل روش‌های گسترش، ناقل اگر وجود دارد، گستردگی جغرافیایی و حضور فصلی میکروب، همین‌طور اثر بهداشت فردی، ژنتیک، عادات و سبک زندگی که خطر عفونت و بیماری را افزایش می‌دهد می‌شود. درخواست از بیمار در خصوص جایی که وی اخیرا سفر کرده است پرسش کلیدی در رسیدن به تشخیص می‌باشد و نشانه‌ای از جهانی شدن بیماری است.

خلاصه

مهم است بدانیم که دانش ما از جهان میکروبی دائماً در حال تکامل است. میکروب‌شناس‌های اولیه یافته‌های پیشگامان خود را مبنایی برای کشفیات خود قرار می‌دهند، ما و نسل‌های بعد از ما نیز این کشفیات را ادامه خواهیم داد و میکروب‌ها، بیماری‌ها و درمان‌های جدیدی را کشف خواهیم کرد. در فصل‌های بعد به یافته‌های جدید اشاره شده است که می‌تواند برای فهم میکروب‌ها و بیماری‌های ناشی از آن‌ها کمک‌کننده باشد.

فصل ۲

میکروبیوم انسان در سلامتی و بیماری

تا زمان تولد، جنین انســان در یک محیط به طور قابل توجهی محافظت شده و اغلب استریل زندگی می‌کند، با این حال، این وضعیت به سرعت همچنان که نوزاد با باکتری‌ها، آرکئه‌آ، قارچ‌ها و ویروس‌ها از مادر، سایر تماس‌های نزدیک و محیــط مواجه می‌گردد تغییر پیــدا می‌کند. در طی چند سال آینده جمعیت ارگانیسم‌ها (میکروبیوتا [Microbiota] یا فلورنرمال [جدول ۱-۲]) روی سطوح پوست، سوراخ‌های بینی، حفره دهانی، روده‌ها و مجرای ادراری تناسلی تشکیل می‌شــوند. تمرکز این فصل دســت‌یابی بــه درک فهم در خصوص نقشی که این جمعیت‌ها در عملکردهای متابولیک و ایمونولوژیــک افراد ســالم ایفا می‌کننــد، فاکتورهایی تنظیم‌کننده ترکیب این جمعیت‌ها و چگونگی تخریب این جمعیت‌ها که می‌تواند منجر به حالت‌های بیماری شود، است.

پروژه میکروبیوم انسان

دانش کنونی ما راجع به میکروبیــوم (Microbiome) حاصل اتمام موفقیت‌آمیز پروژه ژنوم انسان است. ۱۳ سال تلاش بین‌المللی که از سال ۱۹۹۰ آغاز گردید و توالی‌های تقریباً ۳ بیلیون نوکلئوتید که ســازنده ۲۳۰۰۰ ژن کدکننده پروتئین در DNA انسان هستند را مشخص کرد. بسیار شبیه تلاش‌های فرستادن انسان به ماه، بزرگترین نتیجه این کار توسعه تکنولوژی‌ها و راه‌حل‌های اینفورماتیک بود که امکان تولید و آنالیز داده‌های توالی‌یابی DNA و RNA را می‌دهد.

جدول ۱-۲. فهرست واژه‌ها

واژه	تعریف
میکروبیوتا	جامعــه‌ای از میکروب‌ها کــه در درون و روی بدن فرد زندگی می‌کنند، از نظــر ماهیتی می‌تواند بین مکان‌های محیطی و زیست‌گاه‌های میزبان در فرد سالم و بیمار متفاوت باشد.
فلور نرمال	میکروبیوتا
میکروبیوم	مجموعه‌ای مجتمع از ژنوم‌های میکروبی در میکروبیوتا
میکروبیوم مرکزی	گونه‌های میکروبی که به طور معمول بین افراد در جایگاه‌های خاصی از بدن مشــترک هستند، اگرچه به طور تیپیک تعداد گونه‌های محدودی وجود دارند ولی این گونه‌ها بیشــترین میزان جمعیت میکروبی را تشکیل می‌دهند.
میکروبیوم ثانویه	گونه‌های میکروبی که در تنوع منحصر بفرد افراد در مکان‌های خاصی از بدن مشــارکت دارند، به طور تیپیک از نظر نسبی در تعداد کمی وجود دارند.
تنوع عملکردی (Functional Redundancy)	عملکردهای ضروری (مثل متابولیســم مواد غذایی، تنظیم پاســخ ایمنی) که توسط تعداد گوناگونی از میکروبیوتا تأمین می‌گردد.
تنوع تاکسونومیک	تعداد متنوعی از گونه‌ها که میکروبیوتا را تشکیل می‌دهند.
پروتئومیکس (proteomics)	شناخت محصولات پروتئینی جمعیت میکروبیوم
متابولومیکس(metabolomics)	شناخت فعالیت متابولیکی جمعیت میکروبیوم
پری‌بیوتیک	عامل غذایی که رشد یک یا بیشتر اعضاء میکروبیوتا را تقویت می‌کند.
پروبیوتیک	ارگانیسم زنده که وقتی مصرف می‌شود اعتقاد بر این است که برای میزبان مفید می‌باشد.

پروژه میکروبیوم انسان یک مطالعه چندملیتی ۵ ساله بود که به آنالیز ترکیب ژنتیکی (میکروبیوم) جمعیت‌های میکروبی که روی و داخل بدن بالغین سالم زندگی می‌کنند پرداخت. به منظور نشان دادن پیچیدگی این برنامه تخمین زده می‌شود که در میزبان سلول‌های باکتریایی به نسبت ۱۰ به ۱ بیشتر از سلول‌های انسانی می‌باشند و جمعیت باکتریایی حداقل ۳۰۰ برابر بیشتر ژن‌های پروتئین شرکت می‌کند.

پروژه میکروبیوم انسان در سال ۲۰۰۷ با جمع‌آوری نمونه‌هایی از بینی، دهان، پوست، معده و واژن داوطلبین بالغ سالم آغاز گردید. میکروب‌ها به وسیله توالی‌یابی نواحی هدف ژن RNA ریبوزومی 16S شناسایی شدند و اطلاعات راجع به محتوای ژن تمام جمعیت به وسیله توالی‌یابی ژنوم کامل، مجموعه نمونه‌ها تعیین گردید. این آنالیزها نشان داد که تنوع اساسی در ترکیب گونه و ژن برای افراد و در جایگاه‌های مختلف بدن وجود دارد. برای مثال باکتری‌هایی که معده را کلونیزه می‌کنند با باکتری‌هایی که در دهان، پوست و دیگر جایگاه‌های بدن کلونیزه شده‌اند متفاوت هستند. جایگاهی از بدن که بزرگترین **تنوع تاکسونومیک و ژنتیک** را داشت روده بوده و واژن دارای کمترین پیچیدگی بود. محیط‌های ریز از قبیل نواحی مختلف دهان، معده، سطح پوست و واژن نیز میکروبیوم منحصربفرد خود را داشتند. (شکل ۱-۲).

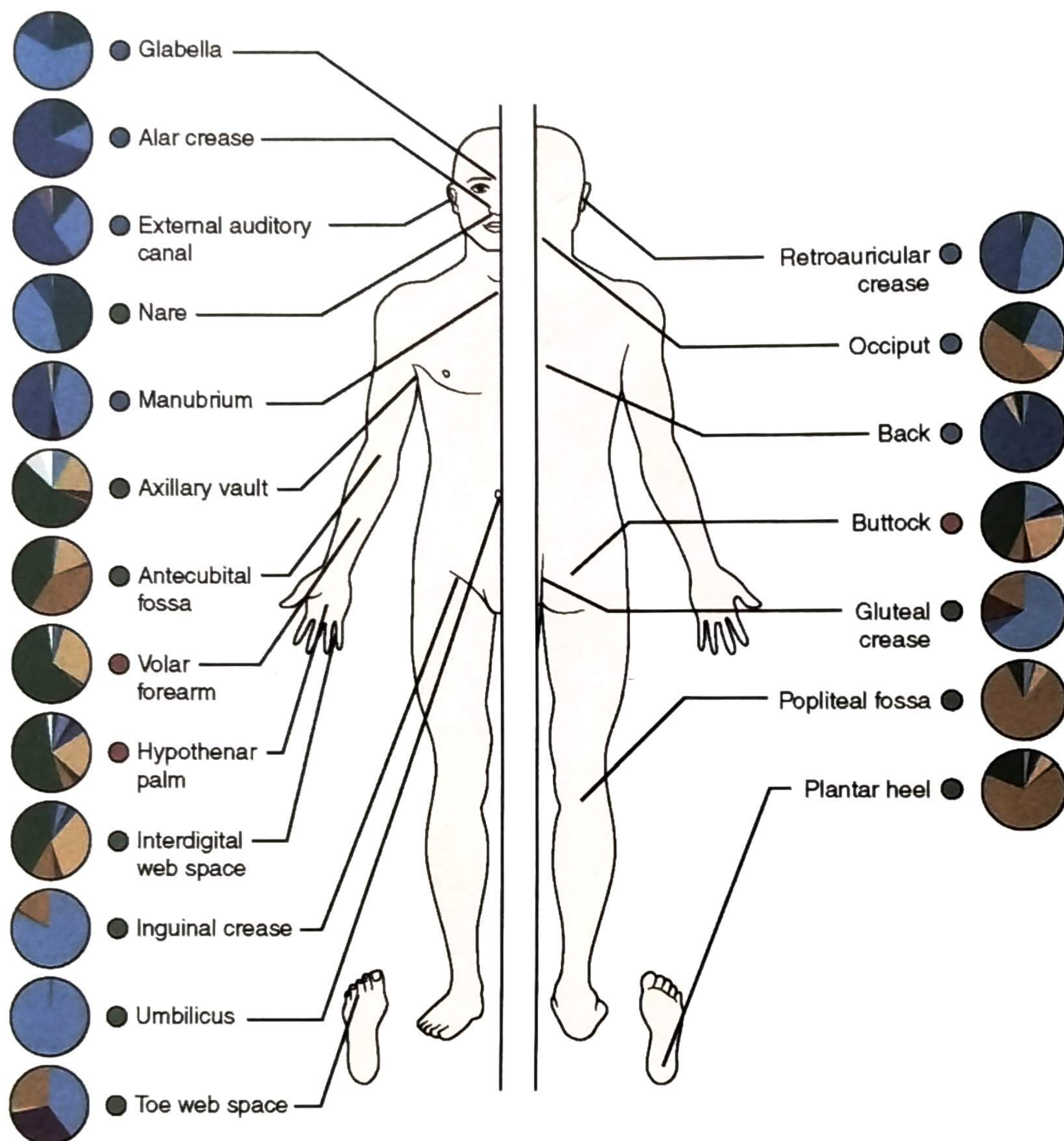
میکروبیوم مرکزی

اغلب افراد دارای یک **میکروبیوم مرکزی** مشترک هستند که به صورت دلخواه به عنوان گونه‌هایی که در جایگاه خاص در ۹۵ درصد افراد یا بیش از آن وجود دارند تعریف می‌شود. بیشترین تعداد گونه‌های مشترک در دهان و پس از آن در بینی، روده و پوست وجود دارند و کمترین گونه‌های مشترک در واژن یافت می‌شوند. علاوه بر این، تعداد اندکی از گونه‌های تشکیل‌دهنده میکروبیوم مرکزی فراوان‌ترین گونه‌ها هستند و نمایانگر جمعیت کلی می‌باشند، در حالیکه بخش باقیمانده جمعیت (**میکروبیوم ثانویه** [Secondary Microbiome]) از تعداد اندکی از بسیاری گونه‌ها که ممکن است به طور وسیع بین افراد مشترک نباشد تشکیل شده است. این می‌تواند بدین معنی باشد که اعضاء میکروبیوم مرکزی بسیار مهم بوده و فراهم‌کننده عملکردهای ضروری هستند که می‌بایست برای فعالیت‌های نرمال متابولیک و ایمونولوژیک وجود داشته باشد. عملکردهای فراهم‌شونده توسط میکروبیوم ثانویه نیز از نظر عملکردی مهم هستند اما می‌تواند توسط انواعی از ارگانیسم‌ها فراهم شوند. به عبارت دیگر، اگرچه انواع فراوانی گونه‌ها بین افراد وجود دارند، اما تنوع کمی در ترکیب ژنتیکی در هر مکان وجود دارد. **تنوع تاکسونومیک** جمعیت زیاد است، اما خصوصیات عملکردی در میکروبیوم‌های مرتبط با سلامتی بسیار حفاظت‌شده (**تنوع عملکردی** [Functional Redundancy]) می‌باشند. تعجب‌آور نیست اگر ما توجه داشته باشیم که میکروبیوم جامعه‌ای است که در ارتباط همزیستی با میزبان خود است، فراهم‌کننده نیاز عملکردهای متابولیک می‌باشد و تحریک‌کننده ایمنی ذاتی و جلوگیری‌کننده از کلونیزه شدن فرد با پاتوژن‌های ناخواسته است. این تنوع‌های بین فردی میکروبیوم می‌تواند در افراد سالم وجود داشته باشد؛ به همین میزان عملکردهای مورد نیاز رضایت‌بخش هستند.

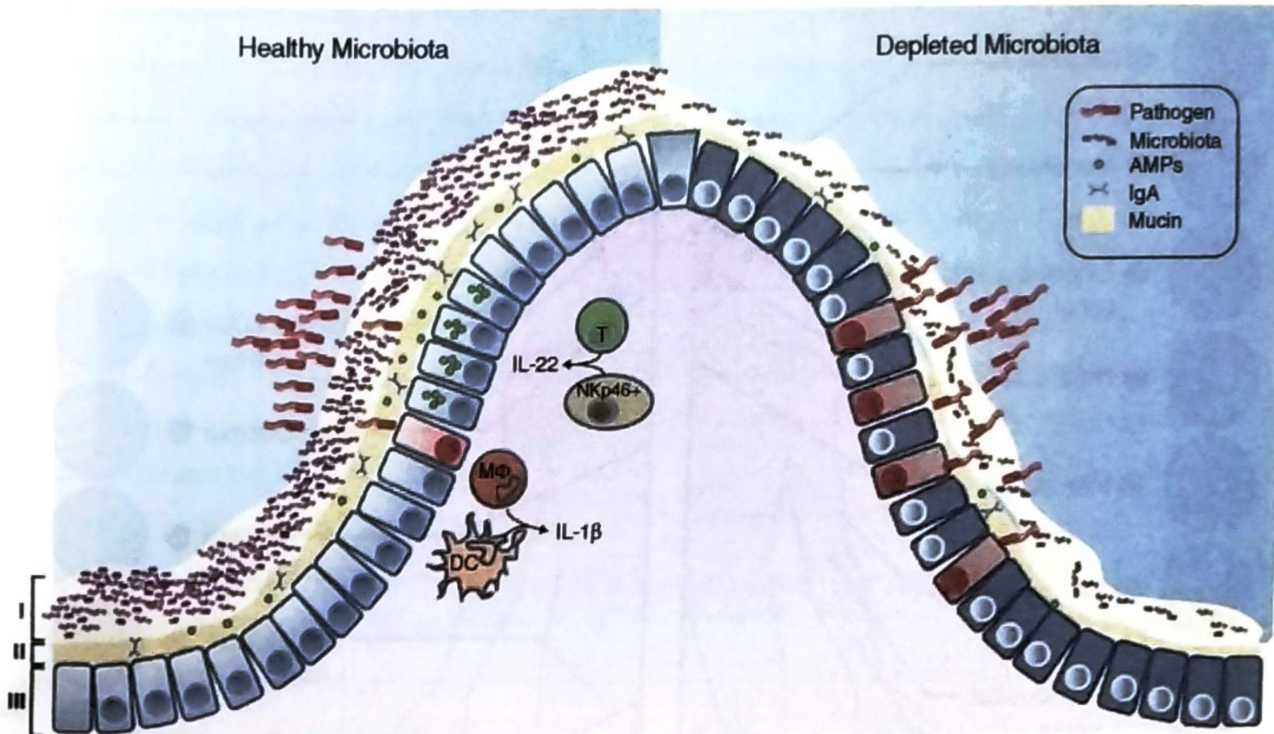
تکامل میکروبیوم و فلور نرمال

فلور نرمال مکانی خاص از بدن از جامعه منحصر بفردی از میکروبیوتا مرکزی و ثانویه تشکیل شده است که از طریق ارتباط همزیستی با میزبان و ارتباط رقابتی با دیگر گونه‌ها شکل می‌گیرد. میزبان مکانی جهت کلونیزه شدن، مواد غذایی و محافظت نسبی در برابر گونه‌های ناخوانده (پاسخ‌های ایمنی ذاتی) فراهم می‌نماید. میکروب‌ها عملکردهای متابولیک موردنیاز، تحریک ایمنی ذاتی و تنظیمی و جلوگیری از کلونیزه شدن با پاتوژن‌های ناخوانده را تأمین می‌کنند (شکل ۲-۲). توانایی تحمل میزان اکسیژن یا فقدان آن (حالت ردوکس) و pH و غلظت نمک، همینطور جمع‌آوری مواد معدنی ضروری و برداشت و متابولیزه مواد غذایی موجود، تعداد و طبیعت گونه‌هایی که در مکانی از بدن ساکن می‌شوند را تعیین می‌کنند. باکتری‌های بی‌هوازی یا بی‌هوازی بی‌اختیاری اغلب مکان‌های بدن را کلونیزه می‌نمایند زیرا اکسیژن در مکان‌هایی از قبیل دهان، روده و مجرای ادراری تناسلی وجود ندارد.

ترکیب میکروبیوتا تحت تأثیر بهداشت شخصی (مثلاً استفاده از صابون، مواد ضدبو، دهان‌شویه، تمیزکننده‌های



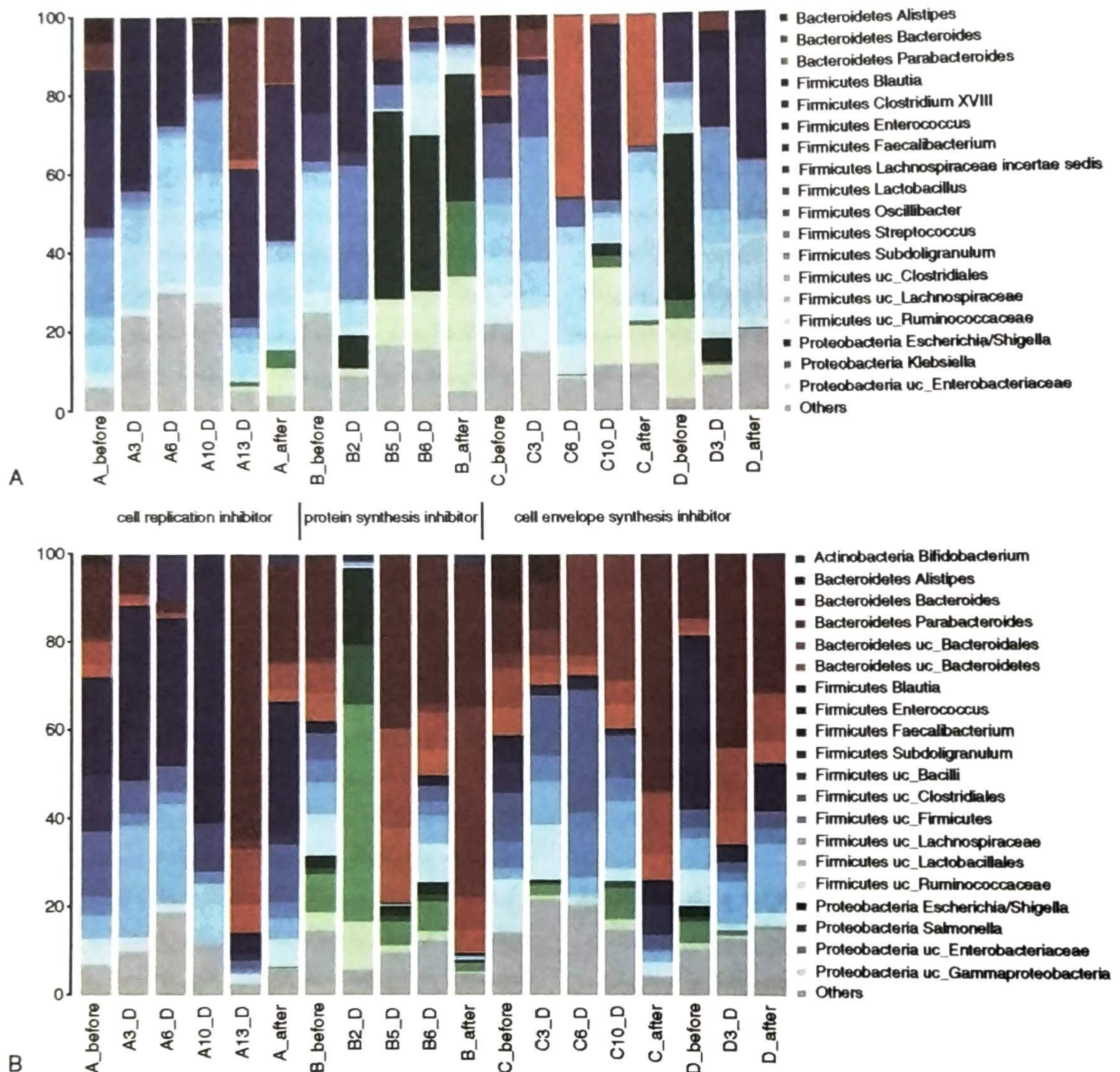
شکل ۱-۲. توزیع توپوگرافیکی باکتری‌ها روی مکان‌های پوست. همانند مکان‌های دیگر بدن، توزیع میکروبیوم پوست وابسته به محیط مکان نمونه‌برداری از قبیل چرب یا روغنی بودن (دایره‌های آبی)، مرطوب بودن (دایره‌های سبز) و سطوح خشک و صاف (دایره‌های قرمز) دارد.



شکل ۲-۲. میکروبیوتا روده‌ای حفاظت‌کننده در برابر عفونت‌های روده‌ای. (I) اشباع مکان‌های کلونیزه شونده و مصرف مواد غذایی دسترسی پاتوژن را به بافت‌های میزبان محدود می‌کند؛ (II) میکروبیوتا به وسیله تحریک تولید موسین، ایمونوگلوبولین A(Ig) و پپتیدهای ضد باکتریایی (Antimicrobial Peptides [AMPs]) ایمنی ذاتی را تحریک می‌نماید؛ و (III) میکروبیوتا بیان اینترلوکین (IL)-۲۲ را تحریک می‌نماید که سبب افزایش مقاومت اپی‌تلیال، تولید IL-1β می‌گردد و از این طریق بازخوانی سلول‌های التهابی را تقویت می‌کند.

پوست، موادی که از راه رکتوم وارد روده می‌شوند، شستشوی واژنی)، تغذیه، منبع آب، موارد پزشکی (به ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها) و تماس با توکسین‌های محیطی است. نوشیدن آب خوب در مقایسه با آب کلرزنی شده شهر یا تغذیه متشکل از میزان کم یا زیاد فیبر، قند یا چربی‌ها می‌تواند برای باکتری‌های روده‌ای مختلف بر پایه توانایی آنها در استفاده از مواد معدنی ضروری (مانند آهن) و مواد غذایی انتخابی باشد. تغییر محیط با غذاها یا موارد پزشکی می‌تواند میکروبیوتا را تغییر دهد (شکل ۳-۲). اگر میکروبیوم مرکزی و خصوصیات عملکردی حیاتی میکروبیوم حفظ شوند این تغییرات قابل قبول هستند اما اگر این عملکردها از دست بروند منجر به بیماری خواهد شد. از نظر تاریخی بزرگترین نگرانی در خصوص استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف به وجود آمدن باکتری‌های مقاوم بود، با این وجود نگرانی بزرگتر باید تخریب میکروبیوم و از دست دادن عملکردهای ضروری باشد.

از تقریباً ۲۰۰ گونه منحصر بفرد باکتری‌ها که سیستم گوارشی را کلونیزه کرده‌اند اغلب آنها اعضاء اکتینوباکتری‌ها (مانند بیفیدوباکتریوم)، باکتروئیدها (مانند باکتروئیدس) و فیرمی‌کوتس (مانند یوباکتریوم، رومینوکوکوس [*Ruminococcus*]، فاکالی باکتر [*Faecalibacterium*]، بلوتیا [*Blautia*] هستند. جالب توجه آنکه اهمیت بسیاری از این باکتری‌ها قبل از اینکه توالی‌یابی ژن جهت شناسایی و تعیین تعداد میکروبیوتا سیستم گوارشی مورد استفاده قرار گیرد ارزیابی نشده بود. در درون کلون برخی باکتری‌ها حاصل مبارزه میان گونه‌ها به منظور تثبیت جایگاه خود در حضور باکتریوسین‌ها (مانند کلیسین‌های تولیدشونده توسط اشرشیاکلی)، سایر پروتئین‌های ضدباکتریایی و متابولیت‌هایی که مانع رشد سایر گونه‌ها می‌شوند، هستند. این ملکول‌ها همچنین از طریق حذف باکتری‌های مهاجم شامل سالمونلا، شیگلا، کلستریدیوم دیفیسیل، باسیلوس سرئوس و سایر پاتوژن‌ها برای میزبان مفید هستند. باکتری‌ها همچنین باید به پپتیدهای ضدمیکروبی و ایمونوگلوبولین A(Ig) تولیدی توسط میزبان و آزادشونده



شکل ۳-۲. اثر آنتی‌بیوتیک‌ها روی میکروبیوتا سیستم گوارشی. نمونه‌های مدفوع از چهار بیمار درمان‌شده آنتی‌بیوتیک‌ها جمع‌آوری شدند: بیمار A، موکسی فلوکساسین؛ بیمار B، پنی‌سیلین به علاوه کلیندامایسین؛ بیمار C، سفازولین و به دنبال آن به وسیله آمپی‌سیلین/ سولباکتام؛ بیمار D، آموکسی‌سیلین. نمونه‌های مدفوع قبل از درمان، در طول درمان (مانند D-3 در واقع روز ۳ درمان است) و پس از درمان برای به دست آوردن میکروبیوم کلی استفاده شدند. تغییرات در طی درمان ثبت گردیدند و پس از درمان این بررسی‌ها قطع شد. A، میکروبیوتا کلی (ژن 16S rRNA).۱. B میکروبیوتا فعال از نظر متابولیکی (رونویسی‌های 16S rRNA).

به درون مجرای گوارشی مقاوم باشند.

متابولیسم مواد غذایی نقش اصلی را در رابطه همزیستی بین میزبان انسانی و میکروب بازی می‌کند. باکتری‌ها موجود در سیستم گوارشی انسان مسئول متابولیزه کردن کربوهیدرات‌های پیچیده (شامل سلولز) به منظور تأمین اسیدهای چرب زنجیر کوتاه از قبیل استات، پروپیونات، و بوتیرات هستند، این اسیدها می‌توانند به راحتی منتقل شده و توسط سلول‌های بدن مورد استفاده قرار گیرند. این اسیدها همچنین رشد باکتری‌های نامطلوب را محدود می‌کنند. سایر باکتری‌ها روی کربوهیدرات‌ها موسین‌هایی

که اپی‌تلیوم را می‌پوشانند یا روغن‌هایی که در عرق ما آزاد می‌شون تغذیه می‌کنند. باکتروئیدها (Bacteroidetes) و فیرمی‌کوتس‌ها در شکستن کربوهیدرات‌های پیچیده شامل ترکیبات دیواره سلولی گیاه (سلولز، پکتین، زایلان [Xylan]) همچنین کربوهیدرات‌های مشتق شده از میزبان شامل آنهایی که به موسین‌ها یا کوندروتین سولفات‌های لایه مخاطی محافظت‌کننده روده متصل می‌شوند از سایرین کارآمدتر هستند. افزایش نسبت این باکتری‌ها در میکروبیوم سیستم گوارشی می‌تواند منجر به کارآیی بالاتر در نگهداری محصولات جانبی متابولیک شود. این مهم می‌تواند برای جمعیت‌های دارای سوءتغذیه یا بیمارانی مبتلا به بیماری‌ها تضعیف‌کننده از قبیل سرطان مفید باشد یا می‌تواند در جمعیت‌های با شرایط تغذیه‌ای خوب منجر به چاقی شود.

نقش میکروبیوم در بیماری

اگر میکروبیوم نرمال ترسیم‌کننده سلامتی است، تغییرات در میکروبیوم می‌تواند نشان‌دهنده بیماری باشد، و ما فقط در آغاز فهم این رابطه هستیم. در سال ۱۸۸۴ روبرت کخ و فریدریچ لوفلر (Friedrich Loeffler) رابطه بین ارگانیسم و عفونت را مشخص کردند. فرضیات کخ بر پایه مفهوم یک ارگانیسم: یک بیماری بود. تحقیق میکروبیوم به عنوان مفهومی جدید معرفی شد. به این معنی که بیماری ایجاد شونده به وسیله جامعه‌ای از ارگانیسم‌ها ایجاد می‌شود تا اینکه توسط یک گونه منفرد باکتری‌ها ایجاد شود و تأثیر ماورای بیماری‌های عفونی سنتی که شامل اختلالات ایمونولوژیک و متابولیک از قبیل بیماری التهابی روده، چاقی، دیابت تیپ ۲ و بیماری سلیاک هستند. هم‌اکنون ما در آغاز عصر جدید شناسایی بیماری‌های عفونی هستیم.

تخریب میکروفلور نرمال (معمولاً تحت عنوان دیسبیوزیس [Dysbiosis] نامیده می‌شود) می‌تواند از طریق حذف ارگانیسم‌های موردنیاز یا اجازه رشد به باکتری‌های نامطلوب منجر به بیماری گردد. برای مثال پس از تماس با آنتی‌بیوتیک‌ها و مهار فلور نرمال روده‌ای کلستریدیوم دیفیسیل می‌تواند تکثیر یافته و انتروتوکسین‌ها را بیان کند که منجر به التهاب کولون (کولیت مرتبط با آنتی‌بیوتیک می‌شود. بیماری دیگر کولون یعنی کولیت اولسراتیو (Ulcerative Colitis) مرتبط با افزایش میزان باکتری‌های تولیدکننده سولفاتازهای تخریب‌کننده موسین است که منجر به تخریب مخاط حفاظتی پوشاننده دیواره روده‌ای و تحریک پاسخ‌های التهابی ایمنی می‌شود. افرادی که دارای میکروبیوتا روده‌ای هستند که در شکستن کربوهیدرات‌های پیچیده کارآمدتر می‌باشند و سبب مصرف شدن این مواد غذایی می‌گردند و بنابراین مستعد چاقی بوده و مستعد سندروم‌های متابولیک از قبیل دیابت تیپ ۲ می‌باشند. نه همه بیماران از نظر ژنتیکی مستعد ابتلا به بیماری سیلیاک بلکه انتروپاتولوژی وابسته به ایمنی که از طریق تماس با پروتئین‌های گلوتن ایجاد می‌شوند علامت‌دار هستند. میکروبیوتا اغلب افراد از باکتری‌هایی که می‌توانند گلوتن‌ها را هضم کنند تشکیل شده است که ممکن است جهت محافظت کردن از این افراد مستعد از نظر ژنتیکی کافی باشد. در فقدان این باکتری‌ها بیماری ممکن است اتفاق بیافتد. تغییرات در میکروبیوم پوست با پیشرفت به سمت عفونت‌های زخم مزمن و وخامت‌های دوره‌ای درماتیت آتوپیک (Atopic Dermatitis) مرتبط است. تغییر در میکروبیوم واژینال از ارگانیسم‌های نسبتاً غالب به جمعیت مخلوط هتروجنوس با پیشرفت به سمت واژینیت همراه است.

تشخیص‌ها و درمان‌ها

درک تأثیر دیسبیوزیس (تخریب میکروفلور نرمال) روی پاتولوژی بیماری می‌تواند هم منجر به بوجود آمدن تست‌های تشخیصی پیشرفته و هم به کار بردن راهکارهایی برای مداخلات درمانی می‌گردد. همانطوری که وجود سالمونلا و شیگلا نشان‌دهنده بیماری است، تغییرات در تنوع و ترکیب میکرو فلور مدفوعی نیز می‌تواند نشان‌دهنده حساسیت به بیماری یا شروع آن باشد. واضح‌ترین مثال بیماری ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل است. این بیماری بالینی به دنبال کاهش فلور نرمال در نتیجه استفاده از آنتی‌بیوتیک ایجاد می‌شود. جالب توجه اینکه بیماران مبتلا به عفونت‌های مزمن عودکننده کلستریدیوم دیفیسیل به طور موفقیت‌آمیزی به وسیله جایگزینی مجدد جمعیت میکروبی (برخی به آن Repoopulating می‌گویند) روده‌ها با پیوندهای مدفوع از همسر یا فرد نسبتا نزدیک یا با نمونه‌های مدفوع

تولیدشده به طور مصنوعی متشکل از مخلوط کمپلکس ارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی مدفوعی درمان می‌شوند.

تغییرات جزئی در میکروبیوم سیستم گوارشی ممکن است زمینه‌ساز به وجود آمدن بیماری‌هایی از قبیل **انتروکولیت نکروزدهنده (NEC)** باشد که یک بیماری التهابی روده بوده و زمینه‌ای برای بروز چاقی است. NEC یک بیماری روده‌ای تحلیل‌برنده بوده که نوزادانی که پیش از موعد متولد شده‌اند را درگیر می‌کند. به صورت آینده‌نگر نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری شده از نوزادان با سن رشد زیر ۲۹ هفته که مبتلا به NEC بودند نشان داده که دیسبیوز واضحی قبل از بروز بیماری رخ می‌دهد. نوزادان مبتلا به بیماری NEC زودرس غالباً داری فیرمی‌کوتس‌ها (عمدتاً استافیلوکوکوس) هستند در حالیکه نوزادان مبتلا به بیماری NEC دیررس عمدتاً دارای انتروباکتریاسیه می‌باشند.

اثرات تغییرات میکروبیوم همچنین برای بیماریزایی بیماری التهابی روده و سرطان کلورکتال شرح داده شده است. تکثیر باکتری‌هایی از قبیل آکرمانسیا موسینی‌فیلا (*Akkermansia muciniphila*) که تولیدکننده سولفاتازهای تخریب‌کننده موسین (Mucin-degrading Sulfatases) می‌باشد مسئول تخریب آستر دیواره روده‌ای است. علاوه بر این، افزایش در تعداد اعضاء خانواده بی‌هوازی پری‌ووتلاسه (Prevotellaceae) سبب فراتنظیمی التهاب وابسته به کموکاین می‌گردد. باکتروئیدس فراژیلیس انتروتوکسی ژنیک نیز می‌تواند پاسخ‌های التهابی وابسته به سلول T کمکی را تحریک نماید که همراه با کولیت بوده و پیش‌زمینه هایپرپلازی کلون و تومورهای کلورکتال است. در نهایت، یک عضو کوچک میکروبیوم سیستم گوارشی به نام متانوبروی *باکتر اسمیتی* (*Methanobrevibacter smithii*) هضم گلیکان‌های موجود در رژیم غذایی را به کمک *باکتروئیدس تتایو تائومیکرون* (Bacteroides thetaiotaomicron) و سایر باکتری‌های روده‌ای مرکزی افزایش می‌دهند که منجر به تجمع چربی می‌گردد.

تغییرات میکروبیوم منجر شونده به بیماری ممکن است به وسیله وجود یا عدم وجود میکروب خاص قابل شناسایی نباشد زیرا بیشتر از یک ارگانیسم ممکن است آن عملکرد موردنیاز را فراهم سازند. این احتمال وجود دارد که تشخیص‌های آینده وجود یا عدم وجود محصول ژن خاصی (پروتئومیکس [proteomics] یا عملکرد متابولیک (متابولومیکس [metabolomics]) را اندازه‌گیری خواهند نمود.

پروبیوتیک‌ها

پروبیوتیک‌ها مخلوطی از باکتری‌ها یا مخمرها می‌باشند که پس از مصرف در روده حتی به صورت موقتی کلونیزه شده و تکثیر می‌یابند. مصرف‌کنندگان پروبیوتیک‌ها اعتقاد دارند که آنها از طریق متعادل کردن مجدد میکروبیوم و عملکردهای آن از قبیل افزایش هضم غذا و تنظیم پاسخ ایمنی و ذاتی افراد، عمل می‌کنند. متداول‌ترین دلیلی که مردم از پروبیوتیک‌ها استفاده می‌کنند آن است که سبب تقویت و پایداری عملکرد منظم سیستم گوارشی و بهبودی تحمل به لاکتوز می‌شوند. پروبیوتیک‌ها معمولاً باکتری‌های گرم مثبت (مانند *بیفیدوباکتریوم، لاکتوباسیلوس*) و مخمرها (مانند ساکاروماسیس) هستند. بسیاری از این میکروب‌ها در کپسول‌های قابل هضم و همینطور مکمل‌های غذایی (مانند دوغ، کفیر) وجود دارند. پروبیوتیک‌ها برای درمان اسهال مرتبط با کلستریدیوم دیفیسیل و بیماری التهابی روده، جهت ایجاد محافظت در برابر بیماری سالمونلا و هلیکوباکتر پیلوری، به عنوان درمان برای درماتیت آتوپیک کودک و بیماری‌های خودایمنی، و حتی برای کاهش پوسیدگی‌های دندانی استفاده شده‌اند، اگرچه ارزش پروبیوتیک‌ها برای بسیاری از این شرایط مورد تأیید قرار نگرفته است. اگرچه پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی سالمی هستند، اما همه پروبیوتیک‌ها مؤثر نبوده و نیز برای همه مردم تأثیربخش نیستند. گونه‌ها یعنی مخلوطی از گونه و دوز و میزان زنده بودن ارگانیسم‌های پروبیوتیک موجود در درون فرمولاسیون پروبیوتیک توانایی، کارآیی و پتانسیل درمانی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. آنچه واضح می‌باشد آن است که بسیار شبیه به استفاده از مخلوط‌های مصنوعی پیچیده از ارگانیسم‌ها که جهت درمان بیماری عودکننده کلستریدیوم دیفیسیل استفاده می‌شود، پروبیوتیک‌های باهوش طراحی شونده به صورت دقیق احتمالاً عامل کمکی مهمی برای درمان پزشکی در آینده خواهند بود.

چشم‌انداز

در آینده نزدیک با روش‌های سریع‌تر و ارزان‌تر توالی‌یابی DNA، آنالیز میکروبیوم فرد ممکن است

تست تشخیصی معمولی برای پیش‌بینی و درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها باشد. با این وجود تعدادی از سؤالات باقی‌مانده باید پاسخ داده شوند. این سؤالات شامل: آیا ما می‌توانیم به وسیله بررسی تغییرات در میکروبیوم بیماری را در فرد پیش‌بینی کنیم؛ کدام تغییرات مهم‌تر هستند - عملکرد تاکسونومیک یا ژنتیک؛ آیا ما می‌توانیم به وسیله بررسی تغییرات در میکروبیوم بیماری را در فرد پیش‌بینی کنیم؛ کدام تغییرات مهم‌تر هستند - عملکرد تاکسونومیک یا ژنتیک؛ آیا ما می‌توانیم به وسیله تثبیت مجدد میکروبیوم سالم از بیماری جلوگیری کرده یا بیماری را درمان کنیم؛ آیا می‌توان به وسیله تجویز میکروب‌های جایگزین‌شده خاص (مانند پیوند مدفوع) یا با مخلوط جمعی (پروبیوتیک) از بیماری پیشگیری و یا آن را درمان نمود؛ آیا می‌توان با استفاده از مکمل‌های متابولیک (پری‌بیوتیک‌ها [Prebiotics]) میکروبیوتا سالم را تقویت کرد؛ و اینکه آیا استفاده از میکروبیوم باهوش جهت درمان‌ها می‌تواند جایگزین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها شود؟ سؤال‌های دیگر شامل: نقش ژنوم میزبان، فاکتورهای محیطی و عادات بهداشتی ما در شکل‌گیری میکروبیوم چیست، بدون توجه به پاسخ‌های این سؤال‌ها و دیگر سؤالات، این موضوع مشخص است که ما شاهد آغاز عصر جدید میکروبیولوژی هستیم که می‌تواند به صورت بنیادین دست‌یابی ما به پیش‌بینی، تشخیص و درمان بیماری را تغییر دهد.

سؤال‌ها

۱. ارتباط بین ژنوم انسان و ماده ژنتیکی میکروبیوم کدام است؟

۲. مفاهیم تنوع تاکسونومیک و تنوع ژنتیکی را توضیح دهید؟

۳. مفهوم میکروبیوم مرکزی را توضیح دهید؟

۴. سه مثال راجع به تغییرات میکروبیوم (دیسبیوزیس) بیاورید که مرتبط با بیماری‌های خاصی هستند؟

پاسخ‌ها

۱. ژنوم انسان متشکل از تمام ژن‌های موجود در کروموزوم‌های انسان است. این ژن‌ها تقریباً ۲۳۰۰۰ پروتئین مجزا را کد می‌کنند. مواد ژنتیکی میکروبیوم شامل همه ماده ژنتیکی موجود در باکتری‌هایی است که در درون و روی بدن ما زندگی می‌کنند. این جمعیت باکتریایی در مقایسه با ژنوم انسان حداقل ۱۰۰ برابر بیشتر ژن‌های مجزا را تشکیل می‌دهند.

۲. تنوع ژنتیکی اشاره به جمعیت متنوع گونه‌های باکتریایی تشکیل‌دهنده میکروبیوم دارد. تنوع ژنتیکی این جمعیت اشاره به تعداد ژن‌های کدکننده پروتئین مجزا در میکروبیوم دارد. در حالیکه تنوع تاکسونومیک می‌تواند زیاد باشد (به معنی تعداد زیادی از گونه‌های باکتریایی مختلف در جامعه می‌باشد و از فردی به فرد دیگر بسیار متغیر است)، و تنوع ژنتیکی معمولاً در افراد سالم پایین است. این تنوع عملکردی ضروری است زیرا گونه‌های باکتریایی تعداد زیادی از عملکردهای حیاتی برای پایداری سلامتی انجام می‌دهند.

۳. میکروبیوم مرکزی گونه‌های باکتری‌ها یک فرد می‌باشد که در اغلب افراد در مکان خاصی از بدن وجود دارند. میکروبیوم مرکزی به طور تیپیک از تعداد کمی از گونه‌ها تشکیل شده است اما بخش زیادی از جمعیت میکروبی را شامل می‌شوند. تعداد زیادی از گونه‌های باکتریایی دیگر در افراد کمتر شایع هستند و جمعیت کوچکی از جامعه میکروبی را تشکیل می‌دهند.

۴. بیماری‌های مرتبط با دیسبیوزیس میکروبیوم شامل انتروکولیت ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل، بیماری التهابی روده، عفونت‌های زخم، درماتیت آتوپیک، واژنیت و چاقی هستند.

فصل

۳

استریلیزاسیون، ضد عفونی و گندزدایی

یک جنبه مهم کنترل عفونت‌ها دانستن اصول استریلیزاسیون، ضد عفونی و گندزدایی می‌باشد (کادر ۱-۳).

استریلیزاسیون

استریلیزاسیون از بین بردن تمام میکروب‌ها شامل فرم‌های مقاوم‌تر از قبیل اسپورهای باکتریایی، مایکوباکتریوم‌ها، ویروس‌های بدون انولوپ (بدون لیپید) و قارچ‌ها می‌باشد. این عمل می‌تواند توسط روش‌های فیزیکی، بخارگازها یا استریل‌کننده‌های شیمیایی صورت گیرد (جدول ۱-۳).

بخار اشباع‌شده تحت فشار یک روش استریلیزاسیون مورد استفاده به طور وسیع، ارزان، غیررسمی و مطمئن است. سه پارامتر حیاتی هستند: زمان مجاورت بخار، دما و میزان رطوبت. متداول‌ترین سیکل مورد استفاده جهت استریلیزاسیون استفاده از بخار اشباع گرم‌شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه است. حفظ دمای مناسب حیاتی است زیرا یک کاهش جزئی ۱/۷ درجه سانتی‌گراد زمان موردنیاز جهت تماس را به میزان ۴۸ درصد افزایش می‌دهد. اگر هیچ‌گونه رطوبتی وجود نداشته باشد در آن زمان دما باید به ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد برسد. استریلیزاسیون با استفاده از گرمای خشک نیاز به تماس برای مدت زمان طولانی بوده و بسیاری از وسایل دچار آسیب‌هایی می‌شوند، بنابراین در حال حاضر پیشنهاد نمی‌شود.

گاز اکسید اتیلن (Ethylene Oxide) برای استریل کردن موارد حساس به دما و فشار استفاده می‌شود. تیمار معمولاً برای مدت ۴ ساعت انجام می‌شود و موارد استریل‌شده قبل از آنکه مورد استفاده قرار گیرند باید برای یک ۱۲ ساعت دیگر در مجاورت هوا قرار داده شوند تا گاز

کادر ۱-۳. تعاریف

گندزدا (Antisepsis): استفاده از عوامل شیمیایی روی پوست یا سایر بافت‌های زنده جهت مهار یا حذف میکروب‌ها. فعالیت اسپورکشی (Sporicidal) ندارند.

ضدعفونی کردن (Disinfection): استفاده از روش‌های فیزیکی یا مواد شیمیایی جهت تخریب اغلب اشکال میکروبی. اسپورهای باکتریایی و سایر ارگانیسم‌های نسبتاً مقاوم (مانند مایکوباکتریوم‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها) ممکن است زنده بمانند. مواد ضدعفونی‌کننده به سه دسته تقسیم می‌شوند: مواد با سطح بالا، متوسط و پایین.

میکروب‌کش (Germicide): ماده شیمیایی که توانایی کشتن میکروب‌ها را دارد ولی اسپورها ممکن است زنده بمانند.

مواد ضدعفونی‌کننده سطح بالا: میکروب‌کشی (Germicide) که تمام پاتوژن‌های میکروبی به استثناء تعداد زیادی از اسپورهای باکتریایی را می‌کشد.

مواد ضدعفونی‌کننده سطح متوسط: میکروب‌کشی است که تمام پاتوژن‌های میکروبی به استثناء اندواسپورهای باکتریایی را می‌کشد.

مواد ضدعفونی‌کننده سطح پایین: میکروب‌کشی است که اکثر باکتری‌های رویشی و ویروس‌های انولوپ دار و ویروس‌های با اندازه متوسط را از بین می‌برد.

استریلیزاسیون: استفاده از روش‌های فیزیکی یا عوامل شیمیایی به منظور از بین بردن تمام اشکال میکروبی از جمله اسپورهای باکتریایی.

جدول ۱-۳. روش‌های استریلیزاسیون

روش	غلظت یا سطح
استریل‌کننده‌های فیزیکی (Physical Sterilants)	
بخار تحت فشار	۱۲۱ تا ۱۳۲ درجه سانتی‌گراد برای فاصله‌های زمانی مختلف
فیلتراسیون	۰/۲۲ تا ۰/۴۵ میکرومتر اندازه سوراخ، فیلترهای هپا (HEPA Filters).
اشعه ماوراء بنفش	تماس متغیر در طول موج ۲۵۴ نانومتر.
اشعه یونیزاسیون	تماس متغیر با اشعه میکروویو و گاما.
استریل‌کننده‌های گازی (Gas Vapor Sterilants)	
اکسید اتیلن	۴۵۰ تا ۱۲۰۰ میلی گرم در هر لیتر در ۲۹ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲ تا ۵ ساعت.
بخار پراکسید هیدروژن	۳۰ درصد در ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد.
گاز پلاسما (Plasma Gas)	گاز پراکسید هیدروژن (Hydrogen Peroxide) بسیار یونیزه شده.
استریل‌کننده‌های شیمیایی (Chemical Sterilants)	
پراستیک اسید	۰/۲ درصد
گلوتارآلدهید	۲ درصد

HEPA, High-efficiency Particulate Air

سمی حذف شود. اگرچه اکسیداتیلن بسیار مؤثر است، ولی به دلیل قابلیت اشتعال، انفجار و سرطان‌زایی در حیوانات آزمایشگاهی، کاربرد آن بسیار محدود شده است. به این دلایل اگر جایگزین‌های قابل قبول دیگر در دسترس هستند باید از استریلیزاسیون با استفاده از اکسید اتیلن خودداری شود.

بخارهای پراکسید هیدروژن (Hydrogen Peroxide) به خاطر خاصیت اکسیدکنندگی گاز، یک روش استریلیزاسیون مؤثر است. از پراکسید هیدروژن برای استریل نمودن وسایل استفاده می‌شود. در یک روش دیگر که استریلیزاسیون به کمک گاز پلاسما (Plasma Gas Sterilization) نامیده می‌شود پراکسید هیدروژن بخار می‌شود و سپس رادیکال‌های آزاد پر انرژی توسط فرکانس‌های میکروویو (Microwave Frequency) یا فرکانس‌های رادیویی (Radio Frequency) تولید می‌شوند. از آنجایی که این یک روش استریل نمودن کارآمد بوده که محصولات جانبی سمی تولید نمی‌شود، روش استریلیزاسیون گاز پلاسما جایگزین گاز اکسیداتیلن در بسیاری از موارد کاربردی شده است. با این وجود این روش را نمی‌توان برای موادی که پراکسید هیدروژن را جذب می‌کنند یا با آن واکنش می‌دهند به کار برد.

دو ماده استریل‌کننده شیمیایی (Chemical Sterilants) که همچنان استفاده می‌گردند پراستیک اسید (Peracetic Acid) و گلوتارآلدهید (Glutaraldehyde) می‌باشند. پراستیک اسید یک عامل اکسیدکننده است که فعالیت زیادی دارد و محصولات نهایی آن (یعنی استیک اسید و اکسیژن) غیر سمی هستند. در مقابل، ایمنی با گلوتارآلدهید نگران‌کننده است و هنگام کار با این ماده شیمیایی باید دقت کرد.

ضدعفونی (Disinfection)

میکروب‌ها همچنین توسط روش‌های ضدعفونی از بین می‌روند، اگرچه بیشتر ارگانیسم‌های مقاوم می‌توانند زنده بمانند. متأسفانه اصطلاح *استریلیزاسیون* و *ضدعفونی* تصادفاً بجای هم استفاده می‌شوند که می‌تواند منجر به بعضی از اشتباهات شود. این موضوع بدان دلیل رخ می‌دهد که فرایندهای ضدعفونی، تحت عنوان سطح بالا (High Level)، سطح متوسط (Intermediate Level) و سطح پایین (Low Level) دسته بندی می‌شوند. ضدعفونی سطح بالا معمولاً می‌تواند به اندازه استریلیزاسیون مؤثر باشد درحالیکه اسپور در ضدعفونی سطح متوسط باقی می‌ماند و تعداد زیادی از میکروب‌ها وقتی در معرض ضدعفونی سطح پایین قرار می‌گیرند، می‌توانند زنده باقی بمانند.

حتی طبقه‌بندی ضدعفونی‌کننده‌ها (جدول ۲-۳) براساس سطح فعالیت آن‌ها اشتباه است. کارآیی این روش‌ها تحت‌تاثیر ماهیت موردی که ضدعفونی می‌شود، تعداد و مقاومت ارگانیسم‌های آلوده‌کننده، مقدار حضور مواد آلی (که می‌تواند مواد ضدعفونی را غیر فعال کند)، نوع و غلظت ماده ضدعفونی کننده، مدت و دمای مواجهه قرار می‌گیرد.

ضدعفونی کننده‌های سطح بالا (High-level Disinfectants)

برای موادی که در روش‌های تهاجمی استفاده می‌شوند و نمی‌توانند فرایند استریلیزاسیون را تحمل کنند (مثل

جدول ۲-۳. روش‌های ضدعفونی کردن

روش	غلظت (سطح یا فعالیت)
حرارت	
حرارت مرطوب	۷۵ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه (بالا)
مایع	
گلوتارآلدهید	۲ تا ۳/۲ درصد (بالا)
پراکسید هیدروژن	۳ تا ۲۵ درصد (بالا)
ترکیبات کلر	ppm ۱۰۰۰-۱۰۰ کلر آزاد (بالا)
الکل (اتیل، ایزوپروپیل)	۷۰ تا ۹۵ درصد (متوسط)
ترکیبات فنولی	۰/۴ تا ۵ درصد (متوسط/پایین)
ترکیبات یدوفور	ppm ۵۰-۳۰ ید آزاد در هر لیتر (متوسط)
ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی	۰/۴ تا ۱/۶ درصد (پایین)

انواع خاصی از اندوسکوپ‌ها، تجهیزات جراحی از جنس پلاستیک یا سایر مواردی که نمی‌توانند اتوکلاو را تحمل کنند) کاربرد دارند. در ضدعفونی کردن این وسایل و سایر مواد اگر قبل از ضدعفونی نمودن، سطح این وسایل جهت از بین بردن مواد آلی تمیز شود، مؤثرتر است. مثال‌هایی برای ضدعفونی کننده‌های سطح بالا عبارتند از: استفاده از حرارت مرطوب و استفاده از محلول‌ها از قبیل گلوتارآلدهید، پراکسید هیدروژن، پراستیک اسید و ترکیبات کلرین.

ضدعفونی کننده‌های سطح متوسط (Intermediate-level Disinfectants) (یعنی الکل‌ها (Alcohols)، ترکیبات یدوفور (Compounds Iodophor) و ترکیبات فنولیک (Phenolic Compounds)) برای پاک کردن سطوح و سایر وسایلی که احتمال آلودگی آن‌ها با اسپورهای باکتریایی یا ارگانیسم‌هایی با مقاومت بالا وجود ندارد، استفاده می‌شوند. این روش برای وسایل نیمه بحرانی (Semicritical) و تجهیزاتی مانند اندوسکوپ‌های فایبراپتیک قابل انعطاف (Flexible Fiberoptic Endoscopes)، لارینگواسکوپ‌ها (Laryngoscopes)، اسپیکولوم واژن (Specula Vaginal)، لوله‌های مسیر تنفسی متعاقب بیهوشی و موارد دیگر به کار می‌رود.

مواد ضدعفونی‌کننده سطح پایین (Low-Level Disinfectants) (مانند ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیوم [Quaternary Ammonium]) برای وسایل و تجهیزات غیر بحرانی (Noncritical) مانند بازوبند دستگاه فشار خون، الکترودهای الکتروکاردیوگرام (Electrocardiogram Electrods) و گوشی‌های پزشکی (Stethoscopes) استفاده می‌شود. اگرچه این وسایل با بیمار در تماس هستند، اما در سطوح مخاطی و یا درون بافت‌های استریل وارد نمی‌شوند.

سطح ضدعفونی کننده‌های مورد استفاده برای سطوح محیطی بسته به خطر نسبی که این سطوح به عنوان مخزنی برای ارگانیسم‌های پاتوژن دارند، مشخص می‌شود. برای مثال از مواد ضدعفونی‌کننده با سطح بالا باید به جای پاک کردن سطوح کثیف مثل کف‌ها، سینک‌ها و کابینت‌ها، برای پاک کردن سطوح وسایل آلوده شده به خون استفاده شود. یک استثناء در این قانون زمانی است که سطح خاصی در یک عفونت بیمارستانی (Nosocomial Infection) نقش داشته باشد مانند آلودگی کف حمام با کلستریدیوم دیفیسیل (باکتری اسپوردار بی‌هوازی) یا یک سینک آلوده به پسودوموناس آئروژینوزا. در این موارد باید یک ضد عفونی‌کننده با فعالیت موثر علیه پاتوژن مورد نظر را انتخاب کرد.

گندزدایی (Antisepsis)

عوامل آنتی سپتیک (جدول ۳-۳) برای کاهش تعداد میکروب‌ها روی سطوح پوست استفاده می‌شوند. این ترکیبات به خاطر ایمنی و کارآیی‌شان انتخاب می‌شوند. خلاصه‌ای از خصوصیات این مواد از بین برنده میکروب در جدول ۴-۳ آورده شده است. **الکل‌ها** فعالیت بسیار خوبی علیه تمامی ارگانیسم‌ها به جز اسپورها دارند. الکل‌ها غیر سمی هستند، اگرچه، به خاطر از بین بردن چربی‌ها باعث خشک شدن سطح پوست می‌شوند. الکل‌ها همچنین فعالیت پایداری ندارند و توسط مواد آلی، غیرفعال می‌شوند. بنابراین قبل از به کار بردن الکل سطح پوست باید تمیز شود. **یدوفورها (Iodophors)** نیز مواد آنتی سپتیک بسیار خوبی برای پوست هستند و طیف فعالیت آن مانند الکل است. یدوفورها نسبت به الکل برای پوست سمی‌تر می‌باشند و فعالیت پایدار کمی دارند و توسط مواد آلی غیر فعال می‌شوند. یدوفورها و ترکیبات یددار معمولا همراه با الکل‌ها

جدول ۳-۳. مواد ضدعفونی‌کننده

ماده آنتی سپتیک	غلظت
الکل (اتیل، ایزوپروپیل)	۷۰ تا ۹۰ درصد
یدوفورها	۱ تا ۲ میلی گرم ید آزاد در هر لیتر، ۱ تا ۲ درصد ید موجود
کلرهگزیدین	۰/۵ تا ۴ درصد
پاراکلرومتاکسی لنول	۰/۵ تا ۳/۷۵ درصد
تریکلوزان	۰/۳ تا ۲ درصد

برای ضدعفونی کردن پوست به کار می‌روند. کلرهگزیدین (Chlorhexidine) فعالیت ضد میکروبی وسیعی دارد هرچند نسبت به الکل‌ها بسیار آهسته‌تر ارگانیسم‌ها را می‌کشد. کلرهگزیدین فعالیت پایداری دارد و مواد آلی و سطوح با pH بالا، اثر آن را کاهش می‌دهند. فعالیت پاراکلرومتاکسی لنول (Parachlorometaxylenol [PCMX]) عمدتاً محدود به باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. از آنجایی که این ماده سمی نمی‌باشد و فعالیت پایداری دارد از آن در محصولات شستشو دهنده دست استفاده می‌شود. تریکلوزان (Triclosan) علیه باکتری‌ها موثر است، اما علیه بسیاری از ارگانیسم‌های دیگر مؤثر نمی‌باشد. تریکلوزان به عنوان یک آنتی سپتیک معمول در صابون‌های از بین برنده بو و برخی محصولات خمیر دندان می‌باشند.

مکانیسم‌های عمل

در بخش‌های بعدی به طور مختصر در مورد مکانیسم‌های عمل شایع‌ترین استریل‌کننده‌ها، ضدعفونی‌کننده‌ها و آنتی سپتیک‌ها بحث می‌شود.

حرارت مرطوب (Moist Heat)

تلاش برای استریل کردن مواد با استفاده از آب جوش کارآمد نیست زیرا تنها یک دمای نسبتاً پایینی (۱۰۰درجه سانتی‌گراد) فراهم می‌شود. در حقیقت ایجاد اسپور توسط یک باکتری با جوشاندن یک محلول حاوی ارگانیسم‌ها و سپس کشت دادن مجدد آن محلول مشخص می‌شود. جوشاندن ارگانیسم‌های رویشی (Vegetative Organisms)، آن‌ها را از بین می‌برد ولی اسپورها زنده باقی می‌مانند. در مقابل، بخار تحت فشار در اتوکلاو، یک روش بسیار مؤثر استریلیزاسیون است، دمای بالاتر باعث دناتوره شدن (Denaturation) پروتئین‌های میکروبی می‌گردد. میزان مرگ ارگانیسم‌ها در طی فرایند اتوکلاو سریع است، اما تحت تأثیر دما و مدت زمان اتوکلاو، سایز اتوکلاو، میزان جریان بخار، اندازه و تراکم مواد و وسایل و جایگاه آن‌ها در اتوکلاو می‌باشد. باید مراقب بود

جدول ۴-۳. خصوصیات میکروب‌کشی مواد ضدعفونی‌کننده و آنتی سپتیک‌ها.

مواد	باکتری‌ها	مایکوباکتریوم‌ها	اسپورهای باکتریایی	قارچ‌ها	ویروس‌ها
ضد عفونی‌کننده‌ها (Disinfectants)					
الکل	+	+	–	+	–/+
پراکسید هیدروژن	+	+	–/+	+	+
فنل‌ها	+	+	–	+	–/+
کلر (Chlorine)	+	+	–/+	+	+
یدوفورها	+	–/+	–	+	+
گلوتار آلدهید	+	+	+	+	+
ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی	–/+	–	–	–/+	–/+
مواد آنتی سپتیک (Antiseptic Agents)					
الکل	+	+	–	+	+
یدوفورها	+	+	–	+	+
کلرهگزیدین(Chlorhexidine)	+	+	–	+	+
پاراکلرومتاکسی لنول	–/+	–/+	–	+	–/+
تریکلوزان	+	–/+	–	–/+	+

که حباب‌های هوا ایجاد نشـود، زیرا از نفوذ بخار به درون وسایل جلوگیری می‌کنند. معمولاً اغلب اتوکلاوها در دمای ۱۲۱ تا ۱۳۲ درجه سـانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه یا بیشتر، عمل می‌کنند. اسـپورهای باسیلوس اسـتئاروترموفیلوس (*Bacillus stearothermophilus*) بـه صـورت تجاری و آمـاده را می‌توان برای بررسـی عملکرد استریلیزاسـیون اتوکلاو به کار برد. یک آمپول از اسپور در مرکز وسایلی که قرار است اتوکلاو شوند قرار می‌گیرد در انتهای کار اتوکلاو، آن را بیـرون می‌آورنـد و در دمای ۳۷ درجه سـانتی‌گراد انکوبه می‌نمایند. اگر فرآیند استریلیزاسـیون موفقیت آمیز باشد اسـپورها از بین می‌روند و ارگانیسم‌ها نمی‌توانند رشد کنند.

اکسیداتیلن (Ethylene Oxide)

اکسـید اتیلـن یـک گاز بی‌رنگ (محلـول در آب و حلال‌های آلی رایج) می‌باشد که برای استریلیزاسیون مواد حسـاس به حرارت (Heat-sensitive) کاربرد دارد. فرایند استریلیزاسیون تقریباً آهسته بوده و تحت تأثیر غلظت گاز، رطوبت نسـبی و حجم رطوبت مواد استریل شونده، زمان مواجهه و دما می‌باشد. با دو برابر شدن غلظت اکسید اتیلن زمان مواجهه ۵۰ درصد کاهش می‌یابد و همچنین فعالیت اکسـید اتیلن به ازای هر ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش دما، تقریبا دو برابر می‌شود. استریلیزاسـیون با اکسید اتیلن در رطوبت نسـبی حدود ۳۰ درصد، بهینه اسـت و با بیشـتر شدن یا کمتر شـدن این میزان فعالیت اکسیداتیلن کاهش می‌یابد. این مسئله زمانی مشکل‌ساز است که ارگانیسم‌های آلوده‌کننده روی یک سطح، خشک شده باشند و یا لئوفیلیزه شـده باشند. اکسـید اتیلن فعالیت اسپورسـیدی خود را از طریق آلکیلاسـیون (Alkylation) گروه‌های هیدروکسیل (Hydroxyl)، کربوکسـیل (Carboxyl)، آمینـو (Amino) و سـولفیدریل (Sulfhydryl) انتهایی، اعمال می‌نماید. این فرآیند گروه‌های فعال مورد نیاز جهت بسیاری از فرایندهای متابولیـک ضروری را مهـار می‌کنـد. مثال‌هایی از دیگر گازهای آلکیله‌کننده (Alkylating Gases) مورد اسـتفاده جهت استریلیزاسیون، فرمالدهید (Formaldehyde) و بتا-پروپیولاکتون (β-propiolactone) می‌باشند. از آنجایی که اکسـیداتیلن می‌تواند به بافت‌های زنده آسیب برساند باید قبل از اینکه وسـیله مورد اسـتفاده قرار بگیرد این گاز از روی آن‌ها زدوده شود. مدت زمان این هوادهی معمولا ۱۶ ساعت یا بیشتر است. جهت بررسی عملکرد استریلیزاسیون با اکسیداتیلن از تست اسپور باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis* spore test) استفاده می‌شود.

آلدهیدها (Aldehydes)

همانند اکسیداتیلن، آلدهیدها نیز از طریق آلکیله کردن کار خود را انجـام می‌دهند. فرمالدهیـد و گلوتارآلدهید مشـهورترین آلدهیدها هسـتند که می‌تـوان از هر دو به عنوان استریل‌کننده‌ها (Sterilants) یا ضدعفونی‌کننده‌های سطح بالا (High-Level Disinfectants) استفاده کرد. گاز فرمالدهید می‌تواند در آب حل شـود و یک محلولی به نام فرمالیـن (Formalin) را تولید می‌کنـد. غلظت‌های پایین فرمالین باکتریواستاتیک اسـت (یعنی رشد ارگانیسم ها را مهار می‌کند ولی آن‌ها را نمی‌کشد) در حالیکه در غلظت‌های بالاتر (مثلاً ۲۰ درصد) می‌تواند همه ارگانیسـم‌ها را بکشد. ترکیب فرمالدهید با الکل (مثلاً ۲۰ درصد فرمالدهید در ۷۰ درصد الکل) می‌تواند فعالیت میکروب کشی آن را افزایش دهد. تماس پوست یا غشاء موکوسی با فرمالدهید می‌تواند سمی باشد. گلوتارآلدهید برای بافت‌های زنده سمیت کمی دارد ولی موجب سـوزش پوسـت یا غشـاءهای مخاطی می‌شود. گلوتارآلدهید در سطوح pH قلیایی فعالیت بیشتری داشته (توسط هیدروکسید سدیم فعال می‌شود)، اما در این حالت پایداری کمتری دارد. گلوتارآلدهید همچنین توسـط مواد آلی غیر فعال می‌شود بنابراین مواد باید قبل از مواجهه با گلوتارآلدهید، ابتدا تمیز شوند.

مواد اکسیدکننده (Oxidizing Agents)

مثال‌هایی از مواد اکسیدکننده شامل اوزون (Ozone)، پراستیک اسـید (Peracetic Acid) و پراکسید هیـدروژن (Hydrogene Peroxide) است. پراکسید هیدروژن رایجترین آن‌هاسـت. پراکسـید هیدروژن در غلظـت ۳ تا ۶ درصد بـه طور مؤثر اکثر باکتری‌ها را می‌کشـد و در غلظت‌های بالاتر (۱۰ تا ۲۵ درصد) همه ارگانیسـم‌ها از جمله اسپورها را از بیـن می‌برد. پراکسـید هیدروژن در فرم اکسـیدانی فعال نیسـت، بلکه عامل مؤثر، رادیکال آزاد هیدروکسـیل

(Free Hydroxyl Radical) است که از تجزیه پراکسید هیدروژن بوجود می‌آید. پراکسید هیدروژن برای ضدعفونی کردن ایمپلنت‌های پلاستیکی (Plastic Implants)، لنزهای تماسی (Contact Lenses) و پروتزهای جراحی (Surgical Prostheses) استفاده می‌شود.

هالوژن‌ها (Halogens)

هالوژن‌ها از قبیل ترکیبات حاوی کلر (Chlorine) و ید (Iodine) بطور وسیعی به عنوان ضد عفونی‌کننده استفاده می‌شوند. ترکیبات یددار (Iodine Compounds) مؤثرترین هالوژن‌های در دسترس جهت ضدعفونی کردن می‌باشند. ترکیبات یددار عوامل بسیار فعالی هستند که موجب رسوب پروتئین‌ها و اکسیداسیون آنزیم‌های ضروری (Essential Enzymes) می‌شوند. این ترکیبات عملاً علیه تمام ارگانیسم‌ها حتی اسپورهای باکتریایی و مایکوباکتریوم‌ها فعالیت میکروب کشی دارند. pH و غلظت محلول ید هیچ‌یک روی فعالیت باکتریسیدی آن اثری ندارد، اگرچه کارآیی محلول حاوی ید در غلظت‌های اسیدی به دلیل تولید بیشتر یدهای آزاد، افزایش می‌یابد. سرعت فعالیت ید نسبت به سایر هالوژن‌ها و ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی بیشتر است. با این وجود، فعالیت ید در حضور برخی مواد آلی و غیر آلی مانند سرم، مدفوع، مایع آسیت، خلط، ادرار، تیوسولفات سدیم و آمونیاک کاهش می‌یابد. عنصر ید می‌تواند در محلول آبی یدید پتاسیم یا الکل حل شود یا می‌تواند با یک حامل کمپلکس تشکیل دهد. ترکیب اخیر به عنوان یدوفور (Iodophor) نامیده می‌شود (*iodo* به معنی ید، *phor* به معنی حامل). استفاده از پاویدان آیوداین (Povidone Iodine) (ترکیب ید با پلی وینیل پیرو لیدون) رایج‌تر می‌باشد و نسبتاً پایدار است و برای بافت‌ها و سطوح فلزی غیر سمی است ولی در مقایسه با سایر محلول‌های ید گران قیمت‌تر است.

ترکیبات کلردار (Chlorine Compounds) نیز به عنوان مواد ضدعفونی‌کننده به طور وسیعی استفاده می‌شوند. محلول‌های آبی کلر سریعاً باکتریسیدال هستند اما با این حال مکانیسم عمل آن‌ها مشخص نشده است. کلر در آب ممکن است به سه فرم وجود داشته باشد: عنصر کلر (Cl_2) که یک ماده اکسیدکننده بسیار قوی است، اسید هیپوکلرو (HOCl) و یون هیپوکلریت (OCl_2). کلر همچنین با آمونیاک یا سایر ترکیبات نیتروژن‌دار ترکیب شده و کلرآمین‌ها و یا ترکیبات N-کلرو تشکیل می‌دهد. کلر اثر خود را با اکسیداسیون غیر قابل برگشت گروه‌های سولفیدریل (Sulfhydryl (SH) Groups) آنزیم‌های ضرروی باکتری اعمال می‌نماید. اعتقاد بر این است که هیپوکلریت‌ها با ترکیبات سیتوپلاسمی واکنش داده و ترکیبات سمی N-کلرو را ایجاد می‌نمایند که در متابولیسم سلول اختلال ایجاد می‌کنند. کارآیی کلر با pH رابطه معکوس داشته و در pH اسیدی فعالیت بیشتری دارد. این مسئله با این موضوع که اسید هیپوکلرو نسبت به یون هیپوکلریت فعالیت بیشتری دارد هم‌خوانی دارد. فعالیت ترکیبات کلردار با افزایش غلظت (با دو برابر شدن غلظت، زمان لازم برای نابودی ارگانیسم‌ها ۳۰ درصد کاهش می‌یابد) و دما (۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش دما باعث کاهش ۵۰ تا ۶۵ درصدی در زمان نابودی ارگانیسم‌ها می‌شود) افزایش می‌یابد. مواد آلی و دترجنت‌های قلیایی اثر ترکیبات حاوی کلر را کاهش می‌دهند. این ترکیبات خاصیت میکروب کشی بالایی دارند، اگرچه ارگانیسم‌های مولد اسپور نسبت به کلرین ۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر مقاوم‌تر از باکتری‌های رویشی می‌باشند.

ترکیبات فنلی (Phenolic Compounds)

ترکیبات فنلی (میکروب کش‌ها [Germicides]) به ندرت به عنوان ضدعفونی‌کننده به کار می‌روند. با این وجود، این ترکیبات از نظر تاریخی جالب می‌باشند، زیرا از آن به عنوان یک استاندارد جهت مقایسه فعالیت میکروب کشی سایر ترکیبات ضدعفونی‌کننده استفاده می‌شد. نسبت فعالیت میکروب کشی ترکیبات مورد آزمایش به غلظت مشخصی از فنل نشان دهنده ضریب فنلی (Phenol Coeffcient) است. ضریب فنلی ۱ نشان‌دهنده فعالیت برابر با فنل، و بزرگتر از ۱ نشان دهنده فعالیت کمتر نسبت به فنل و کوچکتر از ۱ نشان دهنده فعالیت بیشتر از فنل می‌باشد. این تست‌ها دارای محدودیت‌هایی می‌باشند زیرا فنل در دمای اتاق خاصیت اسپوروسیدی ندارد (ولی در دماهای نزدیک به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد خاصیت اسپورسیدی دارد) و علیه ویروس‌های بدون محتوای لیپیدی فعالیت ضعیفی

دارد، این موضوع قابل فهم است، زیرا فنل باعث تخریب غشاءهای حاوی لیپید (Lipid-containing Membranes) و در نتیجه آن تراوش محتویات سلولی به بیرون می‌شود. ترکیبات فنولیک علیه مایکوباکتریوم‌های به طور طبیعی مقاوم نیز فعال هستند زیرا در دیواره سلولی این باکتری‌ها غلظت بالایی از چربی‌ها وجود دارد. قرار گرفتن فنل‌ها در معرض ترکیبات قلیایی باعث کاهش چشمگیر فعالیت آن‌ها می‌شود در صورتیکه هالوژن‌دار کردن فنل‌ها باعث افزایش فعالیت آنها می‌گردد. ورود گروه‌های آروماتیک یا آلیفاتیک به درون هسته فنل‌های هالوژنه باعث افزایش فعالیت آن‌ها می‌شود. بیس فنل‌ها (Bisphenols) دو ترکیب فنلی هستند که به هم متصل شده‌اند. فعالیت این ترکیبات نیز توسط هالوژن‌دار شدن افزایش می‌یابد. یک نمونه از ترکیبات بیس فنل‌هالوژن دار، **هگزاکلروفن (Hexachlorophene)** می‌باشد که یک آنتی سپتیک با فعالیت ضد باکتری‌های گرم مثبت است.

ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی (Quaternary Ammonium Compunds)

ترکیبات آمونیوم چهارظرفیتی از چهار گروه آلی که به صورت کووالانسی به نیتروژن متصل می‌باشند، تشکیل شده‌اند. فعالیت میکروب کشی این ترکیبات کاتیونی توسط خاصیت گروه‌های آلی مشخص می‌شود که بیشترین فعالیت توسط گروه‌های طویل ۸ تا ۱۸ کربنی مشاهده شده است. **بنزآلکونیوم کلراید (Benzalkonium)** و **ستیل پیریدینیوم کلراید (Cetylpyridinium)** نمونه‌هایی از ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی می‌باشند. این ترکیبات از طریق دناتوره کردن غشاء سلولی و آزاد کردن ترکیبات درون سلولی اثر خود را اعمال می‌کنند. این ترکیبات در غلظت پایین خاصیت باکتریواستاتیکی و در غلظت بالا فعالیت باکتریوسیدالی دارند، با این وجود ارگانیسم‌هایی مانند پسودوموناس، مایکوباکتریوم و قارچ‌های تریکوفایتون به این ترکیبات مقاوم هستند. در حقیقت بعضی از سویه‌های پسودوموناس می‌توانند در محلول‌های ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی رشد کنند. تعداد زیادی از ویروس‌ها و تمام اسپورهای باکتریایی نیز به این ترکیبات مقاوم می‌باشند. دترجنت‌های یونی، مواد آلی و رقیق سازی، فعالیت ترکیبات آمونیوم چهارظرفیتی را خنثی می‌کنند.

الکل‌ها (Alcohols)

فعالیت میکروب کشی الکل‌ها با افزایش طول زنجیره (حداکثر ۵ تا ۸ کربن) افزایش می‌یابد. **اتانول (Ethanol)** و **ایزوپروپانول (Isopropanol)** شایع‌ترین الکل‌های مورد استفاده هستند. این الکل‌ها دارای فعالیت کشندگی سریعی علیه فرم رویشی باکتری، مایکوباکتریوم‌ها، بعضی قارچ‌ها و ویروس‌های دارای لیپید می‌باشند. متأسفانه الکل‌ها علیه اسپورهای باکتریایی مؤثر نمی‌باشند و فعالیت ضعیفی علیه بعضی از قارچ‌ها و ویروس‌های فاقد لیپید دارند. فعالیت الکل‌ها در حضور آب بیشتر می‌شود. بنابراین الکل ۷۰ درصد نسبت به الکل ۹۵ درصد فعال‌تر است. الکل ضدعفونی کننده رایج سطوح پوست است و وقتی به همراه یدوفور استفاده شود به شدت موثر است. الکل‌ها همچنین برای ضدعفونی کردن مواردی از قبیل دماسنج‌ها به کار می‌روند.

سؤال‌ها

۱. این اصطلاحات را تعریف کنید و برای هر کدام سه مثال بزنید. استریلیزاسیون، ضدعفونی کردن و آنتی سپسیس.

۲. سه سطح ضدعفونی را تعریف کنید و برای هر کدام مثال بزنید؟ چه زمانی از هر سطح استفاده می‌شود؟

۳. چه فاکتورهایی در استریلیزاسیون به روش دمای مرطوب، دمای خشک و اکسید اتیلن دخالت می‌نمایند؟

۴. مکانیسم عمل هر کدام از ضدعفونی‌کننده‌های زیر را توضیح داده و برای هر کدام یک مثال بزنید: ترکیبات یددار، ترکیبات کلردار، ترکیبات فنلی، ترکیبات آمونیوم چهارتایی.

پاسخ‌ها

۱. برای استریلیزاسیون و ضدعفونی کردن تعریف معینی وجود ندارد معمولاً منظور از **استریلیزاسیون** از بین بردن تمام میکروب‌ها از جمله اسپور باکتری‌ها، مایکوباکتریوم، ویروس‌های فاقد پوشش و قارچ‌ها می‌باشد. از جمله عوامل استریلیزاسیون می‌توان اکسید اتیلن، گاز فرمالدهید، پراکسید هیدروژن، پراستیک اسید و گلوتارآلدهید را نام برد. منظور از **ضدعفونی کردن**، از بین بردن اغلب ارگانیسم‌ها می‌باشد اگرچه اغلب میکروب‌های عودکننده می‌توانند در برابر برخی روش‌های ضدعفونی زنده بمانند. از جمله مواد ضدعفونی‌کننده می‌توان حرارت مرطوب پراکسید هیدروژن و ترکیبات فنلی را نام برد.

گندزداها برای کاهش تعداد میکروب‌ها روی پوست به کار می‌روند از جمله مواد گندزدا می‌توان الکل‌ها، یدوفورها، کلرهگزیدین، پاراکلرو متاکسی نول و تریکلوزان را نام برد.

۲. ضدعفونی‌کننده‌ها به ضدعفونی‌کننده‌های سطح بالا، سطوح متوسط و سطح پایین تقسیم می‌شوند. ضدعفونی‌کننده‌های سطح بالا شامل حرارت مرطوب، گلوتارآلدهید، پراکسید هیدروژن، پراستیک اسید و ترکیبات کلردار است. ضدعفونی‌کننده‌های سطح متوسط شامل الکل‌ها، یدوفور و ترکیبات فنلی است. ضدعفونی‌کننده‌های سطح پایین شامل ترکیبات آمونیوم چهارظرفیتی است. اینکه بعضی از این عوامل هم برای ضدعفونی کردن و هم استریلیزاسیون استفاده می‌شوند به علت تفاوت در غلظت و مدت زمان استفاده از این عوامل است. اینکه از کدام نوع ضدعفونی‌کننده استفاده شود به ماده‌ای که قرار است ضدعفونی شود و شرایطی که از این ماده ضدعفونی‌کننده استفاده می‌شود بستگی دارد. ضدعفونی‌کننده‌های سطح بالا برای موادی استفاده می‌شوند که قرار است در پروژه‌های تهاجمی استفاده شوند ولی نمی‌توانند فرایند استریلیزاسیون را تحمل کنند (مانند تجهیزات اندوسکوپی و جراحی که نمی‌توانند اتوکلاو شوند). ضدعفونی‌کننده‌های سطح متوسط برای تمیز کردن سطوح و وسایلی استفاده می‌شوند که احتمال آلودگی آنها با ارگانیسم‌های عودکننده (resillient organisms) وجود دارد. ضدعفونی‌کننده‌های سطح پایین برای وسایل غیربحرانی (مانند دستگاه فشار خون، الکترودها و گوشی‌های پزشکی) استفاده می‌شوند.

۳. حرارت مرطوب وقتی تحت فشار به کار می‌رود اثر بیشتری دارد، زیرا به دما اجازه می‌دهد که بالا رود. سایر فاکتورهایی که در مؤثر بودن حرارت مرطوب اثرگذار هستند شامل مدت زمان اثر و نفوذ بخار به درون اجسام آلوده است. حرارت خشک در صورتی مؤثر است که دما بالا شد و مدت اثر طولانی باشد. استریلیزاسیون با اکسید اتیلن یک فرآیند کند است که تحت تأثیر غلظت گاز، رطوبت نسبی، مدت زمان برخورد و دما قرار دارد. افزایش دما و غلظت و رطوبت نسبی ۳۰ درصد اکسید اتیلن را مؤثرتر می‌کند.

۴. ترکیبات یددار پروتئین‌ها را رسوب می‌دهند و آنزیم‌های ضروری را اکسید می‌کنند. از جمله ترکیبات یددار می‌توان تنتور آیوداین (tincture of iodine) و پاویدان آیوداین را نام برد (یون ترکیب شده با پلی وینیل پیرولیدون). ترکیبات کلردار ترکیبات اکسیدکننده قوی هستند هرچند مکانیسم دقیق عملکرد آنها مشخص نشده است. از جمله ترکیبات کلردار می‌توان عنصر کلر، اسید هیپوکلرو و یون هیپوکلریت را نام برد. ترکیبات کلردار اغلب به صورت مواد سفیدکننده به کار می‌روند. ترکیبات فنلی باعث تخریب غشاهای حاوی لیپید می‌شوند که منجر به تراوش محتویات سلولی می‌شود. از جمله ترکیبات فنلی می‌توان فنل (کربولیک اسید (carbolic acid)، O– فنیل فنول، O– بنزیل–پارا–کلروفنول، P– ترت–آمیل فنول (P-tert-amyl phenol) را نام برد. ترکیبات آمونیوم چهارظرفیتی غشاء سلولی را دناتوره می‌کنند مانند بنز آلکانیوم کلراید و ستیل پیریدینیوم کلراید.

بخش **۲**

اصول کلی تشخیص آزمایشگاهی

فصل

٤

میکروسکوپ و کشت در شرایط آزمایشگاه (in vitro)

یافته‌های میکروب‌شناسی در سال ۱۶۷۶ زمانی که آنتون لیوون هوک (Anton Van Leeuwenhoek) به کمک یکی از میکروسکوپ‌های اولیه خود باکتری‌ها را در آب مشاهده کرد اثبات گردید. بعد از آن پیشرفتی صورت نگرفت تا تقریباً ۲۰۰ سال بعد که پاستور (Pasteur) باکتری را در آزمایشگاه در یک محیط کشت ساخته شده از عصاره قند، مخمر و نمک آمونیوم، کشت داد. در سال ۱۸۸۱ هس (Hesse) از آگار آشپزخانه همسرش برای جامد کردن محیط کشت استفاده کرد که به باکتری‌ها اجازه رشد به صورت کلنی‌های ماکروسکوپی را می‌داد. در تمام این سالها میکروب‌شناسان برای تهیه صدها محیط کشت که امروزه به صورت روتین در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی استفاده می‌شوند، به محیط آشپزخانه برگشته‌اند. اگرچه روش‌های سریع ردیابی آنتی‌ژن میکروب‌ها و روش‌های ملکولی بر پایه نوکلئیک اسید، امروزه جانشین روش کشت برای ردیابی بسیاری از میکروب‌ها شده است ولی توانایی رشد باکتری‌ها در محیط کشت هنوز هم یک شیوه مهم در آزمایشگاه بالینی است. در بسیاری از بیماری‌ها، توانایی رشد میکروارگانیسم در محیط کشت، روش قطعی شناسایی عامل عفونت می‌باشد. این فصل یک دیدگاه کلی در مورد شایع‌ترین تکنیک‌های استفاده شده به روش کشت و میکروسکوپی ارائه می‌دهد و جزئیات بیشتر در قسمت تشخیص آزمایشگاهی در فصل‌های مربوط به هر ارگانیسم بحث می‌شوند.

میکروسکوپی

معمولاً در میکروب شناسی برای دو هدف اساسی از میکروسکوپ استفاده می‌شود: ردیابی اولیه میکروب‌ها و شناسایی اولیه یا قطعی میکروب‌ها. آزمایش میکروسکوپی نمونه‌های بالینی برای شناسایی سلول‌های باکتریایی، عناصر قارچی، انگل‌ها (تخم‌ها، لارو و اشکال بالغ) و انکلوزیون‌های ویروسی موجود در سلول‌های آلوده استفاده می‌شوند. خصوصیات مورفولوژیک ویژه می‌تواند برای شناسایی مقدماتی اکثر باکتری‌ها و شناسایی قطعی بسیاری از قارچ‌ها و انگل‌ها استفاده شوند. ردیابی میکروسکوپی ارگانیسم‌های رنگ آمیزی شده با آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با رنگ‌های فلورسنت یا دیگر نشانگرها برای شناسایی اختصاصی بسیاری از ارگانیسم‌ها مفید بوده و تأیید شده است. پنج روش رایج میکروسکوپی کاربرد دارند (کادر ۱-۴).

روش‌های میکروسکوپی

میکروسکوپ زمینه روشن (نوری)
Brightfield (Light) Microscopy

اجزاء اساسی میکروسکوپ نوری از منبع نوری که نمونه قرار داده شده روی یک صفحه را روشن می‌کند، کندانسور که جهت متمرکز کردن نور بر روی نمونه استفاده می‌شود، دو سیستم عدسی (عدسی چشمی (Objective Lens) و عدسی شیئی (Ocular Lens)) که برای بزرگ کردن تصویر نمونه استفاده می‌شود، تشکیل شده است.

کادر ۱-۴ . روش‌های میکروسکوپی
میکروسکوپ زمینه روشن (نوری)
میکروسکوپ دارک فیلد (زمینه تاریک)
میکروسکوپ فازکنتراست
میکروسکوپ فلورسنت
میکروسکوپ الکترونی

در میکروسکوپ نوری نمونه به وسیله روشن‌سازی نمونه از طریق نور عبور داده شده از کندانسور دیده می‌شود. سپس نمونه ابتدا توسط عدسی شیئی و بعد عدسی چشمی بزرگنمایی می‌شود. بزرگنمایی کلی تصویر، حاصل بزرگنمایی عدسی‌های شیئی و چشمی می‌باشد. سه عدسی شیئی متفاوت معمولاً استفاده می‌شوند که عبارتند از: قدرت پایین (Low Power) (بزرگنمایی ۱۰ برابر) که برای دیدن نمونه استفاده می‌شود. بسیار خشک (High Dry) (بزرگنمایی ۴۰ برابر) که برای مشاهده میکروب‌های بزرگ از قبیل انگل‌ها و قارچ‌های رشته‌ای استفاده می‌شود. روغن امرسیون (Oil Immersion) (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر) که برای مشاهده باکتری‌ها، مخمرها (مرحله تک سلولی قارچ‌ها) و مشاهدات جزئیات مورفولوژیک ارگانیسم‌های بزرگتر و سلول‌ها استفاده می‌شود. عدسی‌های چشمی می‌توانند تصاویر را بزرگتر نمایند (معمولاً ۱۰ تا ۱۵ برابر). از اینرو استفاده از لنز روغن امرسیون (۱۰۰ برابر) همراه با لنز چشمی ۱۰ برابر بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر را ایجاد می‌کند که معمولاً برای دیدن باکتری‌ها در نمونه ضروری است.

محدودیت میکروسکوپ زمینه روشن در وضوح تصویر (یعنی توانایی افتراق اینکه دو شیئی مجزا هستند نه یکی) می‌باشد. قدرت تفکیک (Resolving Power) میکروسکوپ توسط طول موج نور استفاده شده برای نوردهی یا روشن نمودن شیء و زاویه ورود نور به عدسی‌های چشمی (که دیافراگم عددی (Numerical Aperture) نامیده می‌شود) مشخص می‌گردد. هنگامی که روغن بین عدسی شیئی (معمولاً عدسی ×۱۰۰) و نمونه قرار داده می‌شود قدرت تفکیک به بالاترین حد خود می‌رسد زیرا روغن از پراکندگی نور ممانعت می‌کند. بهترین میکروسکوپ نوری قدرت تفکیکی حدود ۰/۲ میکرومتر دارد که امکان دیدن بسیاری از میکروب‌ها (نه ویروس‌ها) را فراهم می‌کند. اگرچه اغلب باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌های بزرگتر را می‌توان با میکروسکوپ زمینه روشن مشاهده کرد ولی ضریب انکسار (Refractive Indices) ارگانیسم و زمینه آن‌ها شبیه می‌باشد. بنابراین ارگانیسم‌ها باید با رنگی که بتوان آن‌ها را مشاهده کرد رنگ آمیزی شوند یا اینکه از یک روش میکروسکوپی جایگزین استفاده گردد.

میکروسکوپ زمینه تاریک (Darkfield Microscopy)

در میکروسکوپ زمینه تاریک همانند میکروسکوپ نوری از عدسی‌های چشمی و شیئی استفاده می‌شود با این حال در میکروسکوپ زمینه تاریک از یک کندانسور خاص (Special Condenser) استفاده می‌شود که از روشن‌سازی مستقیم نمونه جلوگیری می‌نماید. تنها نورهای مایل و نورهای پخش شده به نمونه رسیده و از میان سیستم‌های عدسی عبور می‌کنند و باعث می‌شود نمونه به صورت روشن در یک زمینه تاریک دیده شود. مزیت این روش این است که قدرت تفکیک میکروسکوپ زمینه تاریک به طور قابل توجهی بیشتر از میکروسکوپ نوری می‌باشد (یعنی ۰/۰۲ میکرومتر در میکروسکوپ زمینه تاریک در مقایسه با ۰/۲ میکرومتر در میکروسکوپ زمینه روشن). بدین ترتیب باکتری‌های بسیار نازک مانند ترپونما پالیدیوم (*Treponema pallidum*) (عامل اتیولوژیک سیفلیس) و گونه‌های لپتوسپیرا (*Leptospira* spp.) (عامل لپتوسپیروز) قابل ردیابی می‌باشند. از آن جائیکه نور از اطراف ارگانیسم عبور می‌کند و از میان ارگانیسم عبور نمی‌کند ساختار داخلی ارگانیسم قابل مطالعه نمی‌باشد و این یکی از معایب میکروسکوپ زمینه تاریک می‌باشد.

میکروسکوپ فازکنتراست (Phase-Contrast Microscopy)

با میکروسکوپ فازکنتراست می‌توان جزئیات ساختار درونی میکروب‌ها را بررسی کرد. در این شکل از میکروسکوپ، پرتوهای موازی نور از میان نمونه که دارای تراکم‌های متفاوت است عبور داده می‌شود که طول موج یک پرتو نوری در مقایسه با پرتو نوری دیگر از فاز خارج می‌شود (یعنی پرتوهایی که از میان قسمت متراکم‌تر نمونه عبور می‌کند نسبت به دیگر پرتوها با تأخیر عبور می‌کنند). با استفاده از حلقه‌های حلقوی (Annular Rings) در کندانسور و عدسی شیئی تفاوت‌ها در فاز زیاد می‌شود به طوری که نور درون فاز نسبت به نور خارج از فاز روشن‌تر به نظر می‌رسد. این مسئله باعث ایجاد تصویر سه بعدی (Three-dimensional Image) از ارگانیسم یا نمونه می‌شود و اجازه تجزیه و تحلیل جزئیات بیشتری از ساختارهای درونی فراهم می‌شود.

میکروسکوپ فلورسنت (Fluorescent Microscopy)

برخی از ترکیبات که **فلوروکروم‌ها (Fluorochromes)** نامیده می‌شوند می‌تواند نور ماورای بنفش با طول موج کوتاه یا نور فراآبی (Ultrablue) را جذب کنند و انرژی را به صورت نور مرئی با طول موج بلند ساطع نمایند. اگرچه برخی از میکروارگانیسم‌ها، فلورسنس طبیعی **(اتوفلورسنس [Autofluorescence])** از خود نشان می‌دهند در میکروسکوپ فلورسنت ارگانیسم‌هایی که با رنگ‌های فلورسنت رنگ آمیزی شده‌اند با میکروسکوپ فلورسنت طراحی شده ویژه مورد بررسی قرار می‌گیرند. در میکروسکوپ فلورسنت از لامپ‌های بخار جیوه (Mercury)، هالوژن (Halogen) یا زنون (Xenon) با فشار بالا استفاده می‌شود که این لامپ‌ها در مقایسه با میکروسکوپ زمینه روشن سنتی طول موج‌های کوتاهتری ساطع می‌کنند. یک سری فیلتر برای مهار گرمای تولید شده از لامپ، حذف نور مادون قرمز و انتخاب طول موج مناسب برای برانگیختن فلوروکروم استفاده می‌شود. نور ساطع شده از فلوروکروم از طریق عدسی‌های چشمی و شیئی معمولی تشدید می‌شود. ارگانیسم‌ها و نمونه‌هایی که با فلوروکروم رنگ شده‌اند به صورت روشن و درخشان در برابر زمینه تاریک دیده می‌شوند با این حال تنوع رنگ‌ها به نوع فلوروکروم انتخابی بستگی دارد. تباین بین ارگانیسم و زمینه به اندازه کافی زیاد هست که بتوان سریعاً نمونه را توسط بزرگنمایی پایین از نظر وجود فلورسنس مورد بررسی قرار داد و سپس محل‌هایی را که فلورسنس در آنجا قابل مشاهده است با استفاده از بزرگنمایی بیشتر بهتر بررسی کرد.

میکروسکوپ الکترونی (Electron Microscopy)

برعکس بقیه میکروسکوپ‌ها در میکروسکوپ الکترونی از **سیم‌پیچی‌های مغناطیسی (magnetic coils)** (به جای عدسی) برای هدایت مستقیم پرتوهای الکترون حاصل از رشته تنگستن (Tungsten Filament) از میان نمونه و برخورد به صفحه نمایش، استفاده می‌شود. از آنجایی که در میکروسکوپ الکترونی از طول موج‌های بسیار کوتاهتری از نور استفاده می‌شود بزرگنمایی و وضوح به طور چشمگیری زیاد می‌شود. ذرات ویروسی خاص (با انکلوزیون‌های ویروسی متفاوت هستند) را می‌توان توسط میکروسکوپ الکترونی مشاهده کرد. برای ایجاد تباین معمولا نمونه‌ها رنگ آمیزی می‌گردند یا با یون‌های فلزی پوشانیده می‌شوند. دو نوع میکروسکوپ الکترونی وجود دارد: **میکروسکوپ‌های الکترونی گذاره (Transmission Electrone Microscopes)** که در آن الکترون همانند نور مستقیماً از نمونه عبور می‌کند و **میکروسکوپ‌های الکترونی نگاره (Scanning Electrone Microscopes)** که در آن الکترون از سطح نمونه در زاویه‌ای به خارج پرتاب شده و تصویر سه بعدی ایجاد می‌شود. با وجود روش‌های بسیار حساس و اختصاصی تکثیر اسیدنوکلئیک که به عنوان تست تشخیصی اولیه هم‌اکنون مورد استفاده قرار می‌گیرند امروزه میکروسکوپ الکترونی بیشتر به عنوان یک وسیله تحقیقاتی استفاده می‌شود تا ابزار تشخیصی.

روش‌های آزمایش

نمونه‌های کلینیکی یا سوسپانسیونی از میکروارگانیسم‌ها را می‌توان روی یک اسلاید شیشه‌ای قرار داد و در زیر میکروسکوپ بررسی کرد (یعنی بررسی مستقیم یک گسترش مرطوب [Wet Mount]). اگرچه ارگانیسم‌های بزرگ و مواد سلولی می‌توانند با استفاده از این روش دیده شوند، اما تجزیه و تحلیل جزئیات داخلی اغلب مشکل است. استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست می‌تواند به این مشکلات غلبه کند. به عنوان روش جایگزین می‌توان ارگانیسم یا نمونه را توسط روش‌های مختلف نیز رنگ آمیزی نمود (جدول ۱-۴).

آزمایش مستقیم (Direct Examination)

روش‌های آزمایش مستقیم ساده‌ترین روش برای آماده‌سازی نمونه جهت بررسی میکروسکوپی است. نمونه‌ها را می‌توان در آب یا سالین به صورت سوسپانسیون درآورد (**گسترش مرطوب**) و برای حل نمودن مواد زمینه‌ای نمونه را با قلیا مخلوط می‌کنند (**روش هیدروکسید پتاسیم (Potassium Hydroxide [KoH] Method)**) یا می‌توان نمونه را با قلیا و رنگ‌های متضاد (مانند **لاکتوفنل کاتن**

جدول ۱-۴. آماده سازی نمونه میکروسکوپی و رنگ‌های مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی بالینی.

روش رنگ آمیزی	اصول و کاربردها
بررسی مستقیم (Direct Examination)	
گسترش مرطوب	تهیه نمونه بدون رنگ آمیزی، که توسط میکروسکوپ زمینه روشن، دارک فیلد یا فازکنتراست بررسی می‌شود.
هیدروکسید پتاسیم ۱۰درصد (10% KOH)	هیدروکسید پتاسیم برای حل کردن مواد پروتئین‌دار و تسهیل ردیابی عناصر قارچی که محلول‌های قوی قلیایی روی آن‌ها اثر ندارد، استفاده می‌شود. رنگ‌هایی مانند لاکتو فنل کاتن بلو را می‌توان جهت افزایش تباین بین عناصر قارچی و زمینه اضافه کرد.
جوهر هندی	یک روش هیدروکسید پتاسیم اصلاح شده است که جوهر به عنوان یک ماده ایجادکننده کنتراست، اضافه می‌شود. این رنگ بیشتر برای ردیابی گونه‌های کریپتوکوکوس در مایع مغزی نخاعی و سایر مایعات بدن استفاده می‌شود. کپسول پلی ساکاریدی گونه‌های کریپتوکوکوس رنگ را به درون خود راه نمی‌دهند و یک هاله روشنی اطراف سلول مخمر ایجاد می‌کنند.
لوگول یدین	ید به نمونه‌های انگل شناسی تهیه شده بصورت مرطوب برای افزایش تباین بین ساختارهای داخلی، اضافه می‌شود. افتراق انگل را از سلول‌های سفید خونی تسهیل می‌کند.
رنگ‌های افتراقی (Differential Stains)	
رنگ‌آمیزی گرم	متداول‌ترین رنگ مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی است که تشکیل‌دهنده اصولی جهت گروه‌های بزرگ باکتری‌ها (مثلاً گرم مثبت، گرم منفی) می‌باشد. پس از فیکس نمودن نمونه بر روی اسلاید شیشه‌ای (به وسیله تیمار با گرما یا الکل)، روی نمونه کریستال ویوله ریخته می‌شود و سپس ید به منظور تشکیل کمپلکس با رنگ اولیه، اضافه می‌گردد. در طی رنگبری با الکل یا استون، این کمپلکس در باکتری‌های گرم مثبت باقی می‌ماند اما در ارگانیسم‌های گرم منفی خارج می‌شود، رنگ زمینه سافرانین به وسیله ارگانیسم‌های گرم منفی نگه داشته می‌شود (از این رو به رنگ قرمز دیده می‌شوند). میزان رنگی که ارگانیسم در خود نگه می‌دارد بستگی به عملکرد ارگانیسم، شرایط کشت و مهارت رنگ‌آمیزی فرد کارکننده با میکروسکوپ، دارد.
رنگ هماتوکسیلین آهن	برای ردیابی و شناسایی انگل‌های مدفوع به کار می‌رود. تخم و لاروهای کرم‌ها به شدت رنگ می‌گیرند و خیلی آسان در گسترش مرطوب آماده شده شناسایی می‌شوند.
متامین سیلور Methenamine) (Silver	عمدتاً در آزمایشگاه‌های هیستولوژی نسبت به آزمایشگاه میکروب‌شناسی کاربرد بیشتری دارد. اساساً برای ردیابی عناصر قارچی در بافت استفاده می‌شود، اگرچه، می‌توان سایر ارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها را نیز ردیابی کرد. رنگ آمیزی سیلور (Silver Staining) نیاز به مهارت دارد زیرا رنگ آمیزی به صورت غیر حرفه‌ای باعث تهیه اسلایدهایی می‌شود که غیر قابل تفسیر می‌باشند.
رنگ تولوئیدن بلو O Toluidine Blue O) (Stain	اساساً برای ردیابی ارگانیسم‌های پنوموسیستیس در نمونه‌های تنفسی کاربرد دارد. کیست‌ها به رنگ آبی متمایل به قرمز تا ارغوانی در زمینه روشن دیده می‌شوند. رنگ زمینه را می‌توان با معرف سولفاتین (Sulfatin Reagent) از بین برد. سلول‌های مخمر نیز رنگ می‌شوند و تشخیص آن از سلول‌های پنوموسیستیس دشوار است. تروفوزوئیت‌ها رنگ نمی‌شوند و در بسیاری از آزمایشگاه‌ها رنگ‌های فلورسنت اختصاصی جایگزین این روش شده است.
رنگ تری کروم (Trichrome Stain)	یک جایگزین برای روش هماتوکسیین آهن جهت رنگ آمیزی انگل‌ها است. در این رنگ‌آمیزی پروتوزوآها دارای سیتوپلاسم‌هایی به رنگ سبز-آبی تا ارغوانی و هسته و اجسام اِنکلوزیونی، قرمز یا متمایل به ارغوانی دیده می‌شوند. زمینه نمونه سبز است.
رنگ رایت-گیمسا	برای ردیابی انگل‌های خونی، انکلوزیون بادی ویروسی و کلامیدیا، بورلیا، توکسوپلاسما، پنوموسیستیس و گونه‌های ریکتزیا استفاده می‌شود. رنگ پلی کروماتیک حاوی مخلوط متیلن بلو، آزور B و ائوزین Y است. رنگ گیمسا حاوی متیلن بلو و ائوزین است. یون‌های ائوزین بار منفی دارند و ترکیبات اصلی سلول را نارنجی تا صورتی می‌کنند در حالیکه بقیه رنگ‌ها ساختارهای اسیدی سلول را به درجات مختلفی آبی تا ارغوانی می‌کنند. در تروفوزوئیت‌های پروتوزآ هسته به رنگ قرمز و سیتوپلاسم به رنگ آبی-خاکستری در می‌آید. مخمرهای درون سلولی و انکوزیون بادی‌ها معمولا آبی می‌شوند. ریکتزیا، کلامیدیا و گونه‌های پنوموسیستیس به رنگ ارغوانی در می‌آیند.

جدول ۱-۴. آماده سازی نمونه میکروسکوپی و رنگ‌های مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب‌شناسی بالینی

روش رنگ آمیزی	اصول و کاربردها
رنگ‌های اسیدفست (Acid-Fast Stains)	
رنگ زیل نلسون	برای رنگ آمیزی مایکوباکتریوم‌ها و سایر ارگانیسم‌های اسید- فست استفاده می‌شود. ارگانیسم با کربول فوشین بازی (Basic Carbol Fuchsin) رنگ می‌شود و سپس با محلول‌های اسیدی-قلیایی (Acid-alkali Solutions) رنگ‌بری می‌شود. زمینه با متیلن بلو رنگ آمیزی می‌گردد. ارگانیسم به رنگ قرمز در زمینه آبی روشن دیده می‌شود. برای جذب کربول فوشین توسط باکتری‌ها نیاز به حرارت دادن نمونه (رنگ اسید-فست گرم (Hot Acid-Fast Stain)) است.
رنگ کینیون	رنگ اسید-فست سرد (Cold Acid-Fast Stain) است (نیازی به حرارت دادن ندارد)، اصول آن همانند زیل نلسون است.
رنگ اورامین- رودامین	اصول آن همانند سایر رنگ‌های اسید-فست است به جز اینکه از رنگ‌های فلورسنت (اورامین (Auramine) و رودامین (Rhodamine)) به عنوان رنگ اولیه و از پرمنگنات پتاسیم (Potassium Permanganate) (عامل اکسیدکننده قوی) به عنوان رنگ زمینه (Counterstain) و غیر فعال‌کننده رنگ‌های فلوروکروم متصل نشده، استفاده می‌شود. ارگانیسم‌های فلورسنس به رنگ زرد مایل به سبز در زمینه تاریک دیده می‌شوند.
رنگ اسید فست اصلاح شده Modified Acid-Fast) (Stain	در صورتی که در هر یک از روش‌های رنگ آمیزی اسید-فست از ماده رنگبر ضعیفی استفاده شود به عنوان رنگ آمیزی اسید فست تغییر یافته نامیده می‌شود. در حالیکه مایکوباکتریوم اسید-فست قوی بوده، دیگر ارگانیسم‌ها (نوکاردیا (*Nocardia*)، رودوکوکوس (*Rhodococcus*)، تسوکامورلا (*Tsukamurella*) و گوردونه (*Gordonia*))، کریپتوسپوریدیوم (*Cryptosporidium*)، ایزوسپورا (*Isospora*)، سارکوسیستیس (*Sarcocystis*) ضعیف‌تر رنگ می‌گیرند. این ارگانیسم‌ها می‌توانند با استفاده از ماده رنگبر ضعیف موثرتر رنگ شوند. ارگانیسم‌هایی که این رنگ را در خود حفظ می‌نمایند تحت عنوان اسید فست نسبی (Partially Acid-Fast) نامیده می‌شوند.
رنگ‌های فلورسنت (Fluorescent Stains)	
رنگ آکریدین - اورانج Acridine Orange) (Stain	جهت ردیابی باکتری‌ها و قارچ‌ها در نمونه‌های بالینی استفاده می‌شود. این رنگ‌ها وارد اسید نوکلئیک (سالم یا دناتوره شده) می‌شوند. در pH خنثی باکتری‌ها، قارچ‌ها و مواد سلولی به رنگ قرمز متمایل به پرتقالی مشاهده می‌شوند. در pH اسیدی (حدود ۴) باکتری‌ها و قارچ‌ها به رنگ قرمز- پرتقالی در می‌آیند اما زمینه به رنگ سبز مایل به زرد مشاهده می‌شود.
رنگ اورامین-رودامین	همانند رنگ‌های اسیدفست می‌باشد.
رنگ کالکوفلور سفید	برای ردیابی عناصر قارچی و گونه‌های پنوموسیستیس به کار می‌رود. رنگ به سلولز و کیتین موجود در دیواره سلولی متصل می‌شود. میکروسکوپیست می‌تواند رنگ را با KOH مخلوط کند (در تعداد زیادی از آزمایشگاه‌ها این روش جایگزین روش قدیمی رنگ KOH شده است).
رنگ آنتی‌بادی فلورسنت مستقیم	آنتی‌بادی‌ها (مونوکلونال و پلی کلونال) با مولکول‌های فلورسنت ترکیب می‌شوند. اتصال اختصاصی به یک ارگانیسم به وسیله فلورسنس میکروبی ردیابی می‌شود. این روش جهت ردیابی یا شناسایی بسیاری از ارگانیسم‌ها (مانند *استرپتوکوکوس پایوژنز، بوردتلا، فرانسیسلا، لژیونلا، کلامیدیا، پنوموسیستیس، کریپتوسپوریدیوم، ژیاردیا، ویروس آنفولاآنزا، هرپس سیمپلکس ویروس*) مفید می‌باشد. حساسیت و اختصاصیت این تست به وسیله تعداد ارگانیسم‌های موجود در نمونه آزمایش و کیفیت آنتی‌بادی مورد استفاده تعیین می شود.

KOH, هیدروکسید پتاسیم.

بلو (Lactophenol Cotton Blue)، ید (Iodine)) مخلوط نمود. رنگ‌ها به طور غیر اختصاصی مواد سلولی را رنگ می‌کنند و باعث افزایش تباین با زمینه می‌شوند و امکان بررسی ساختارهای جزئی را فراهم می‌کند. در یک روش متفاوت به نام روش رنگ آمیزی مرکب چین (India Ink Method)، جوهر، زمینه را نسبت به سلول تیره‌تر می‌کند. این روش برای ردیابی کپسول‌های احاطه‌کننده ارگانیسم‌ها مانند مخمر کریپتوکوکوس (در این روش رنگ وارد کپسول نمی‌شود و یک هاله روشن در اطراف سلول مخمر دیده می‌شود) و باسیلوس آنتراسیس کپسول‌دار استفاده می‌شود.

رنگ‌های افتراقی (Differential Stains)

رنگ‌های افتراقی متنوعی برای رنگ آمیزی اختصاصی ارگانیسم‌ها یا اجزاء سلول استفاده می‌شوند. رنگ آمیزی گرم شناخته شده ترین و پرکاربردترین رنگ مورد استفاده است و اساس طبقه بندی فنوتیپیک باکتری‌ها می‌باشد. مخمرها را نیز می‌توان با این روش رنگ آمیزی کرد (مخمرها گرم مثبت هستند). هماتوکسیلین آهن (Iron Hematoxylin) و تری کروم (Trichrome) برای شناسایی تک یاخته‌ها، پروتوزآها، ارزشمند هستند و رنگ آمیزی رایت-گیمسا (Wright-Giemsa Stain) برای شناسایی انگل‌های خونی و سایر ارگانیسم‌های انتخابی، ارزش دارند. رنگ‌های افتراقی یا فلوروسنت حساستر و از نظر تکنیکی آسان‌تر هستند و به میزان زیادی جایگزین روش‌های رنگ آمیزی از قبیل متنامین سیلور و تولوئیدن بلو O شده‌اند.

رنگ‌های اسید - فست (Acid-Fast Stains)

حداقل سه رنگ اسید-فست مختلف استفاده می‌شود و روش کار هر کدام بر پایه این حقیقت است که بعضی ارگانیسم‌ها رنگ اولیه را حتی در حضور رنگ‌برهای قوی از قبیل ترکیبی از اسیدها و الکل‌ها از دست نمی‌دهند. زیل-نلسون (Ziehl-Neelsen) قدیمی‌ترین روش مورد استفاده بوده ولی در هنگام رنگ‌آمیزی نیاز به حرارت‌دهی نمونه می‌باشد. در تعداد زیادی از آزمایشگاه‌ها روش رنگ‌آمیزی اسید-فست سرد (روش کینیون (Kinyoun Method) و رنگ آمیزی فلوروکروم (روش اورامین-رودامین (Auramine-rhodamine Method)) جایگزین روش زیل نلسون شده است. روش رنگ آمیزی فلوروکروم (Fluorochrome Method) روش انتخابی است زیرا قسمت وسیعی از نمونه را می‌توان سریعاً توسط جستجوی ارگانیسم‌های درخشان (فلورسنت) در زمینه تاریک بررسی نمود. بعضی از ارگانیسم‌ها اسید فست نسبی (Partially Acid-Fast) هستند و می‌توانند تنها در حضور رنگ‌برهای اسیدی ضعیف رنگ اولیه را در خود نگه دارند. این خصوصیت تنها در ارگانیسم‌های کمی یافت می‌شود (جدول ۱-۴ را ببینید) و برای شناسایی اولیه آن‌ها کاملاً با ارزش است.

رنگ‌های فلورسنت (Fluorescent Stains)

رنگ اسید فست اورامین-رودامین (Auramine-rhodamine Acid-Fast Stain) یک مثال اختصاصی برای رنگ‌های فلورسنت می‌باشد. از رنگ‌های فلورسنت متعددی جهت رنگ آمیزی نمونه‌ها استفاده می‌شود. برای مثال رنگ آکریدین اورنج (Acridine Orange Stain) را می‌توان برای رنگ آمیزی باکتری‌ها و قارچ‌ها و رنگ‌های کالکوفلور سفید (Calcofluor White) برای رنگ‌آمیزی دیواره سلولی قارچ‌ها استفاده کرد. اگرچه رنگ آکریدین اورنج کاربردهای محدودی دارد، اما رنگ کالکوفلور سفید جایگزین رنگ‌های هیدروکسید پتاسیم شده است. روش دیگر برای بررسی نمونه‌ها استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی نشاندار شده با رنگ فلورسنت (رنگ‌های آنتی‌بادی فلورسنت (Fluorescent Antibody Stains)) می‌باشد. بررسی حضور ارگانیسم‌های فلورسنت شده یک روش سریع برای شناسایی و تأیید ارگانیسم می‌باشد.

کشت در شرایط آزمایشگاه (In Vitro)

موفقیت روش‌های کشت به بیولوژی ارگانیسم، محل عفونت، پاسخ ایمنی بیماران به عفونت و کیفیت محیط‌های کشت، بستگی دارد. باکتری *لژیونلا* یک پاتوژن مهم تنفسی است با این وجود در هیچ محیط کشتی رشد نمی‌کرد، تا اینکه مشخص شد ارگانیسم برای رشد به محیط‌هایی حاوی آهن (Iron) و ال- سیستئین (L-cysteine) بعنوان مکمل نیاز

دارد. *کمپیلوباکتر*، یک پاتوژن مهم روده‌ای، از نمونه‌های مدفوعی جداسازی نشد تا اینکه محیطهای بسیار انتخابی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در شرایط میکروآئروفیلیک انکوبه شدند. *کلامیدیا*، یک باکتری مهم عامل بیماری‌های منتقله از طریق جنسی، پاتوژن درون سلولی اجباری است که باید حتماً درون سلول‌های زنده رشد داده شود. *استافیلوکوکوس اورئوس* که عامل سندرم شوک توکسیک می‌باشد، به وسیله آزاد کردن توکسین درون سیستم گردش خون ایجاد بیماری می‌کند. کشت خون تقریباً همیشه منفی است ولی با انجام کشت از محل‌هایی که این ارگانیسم در حال رشد است، ارگانیسم شناسایی خواهد شد. در بسیاری از عفونت‌ها (مانند گاستروانتریت، فارنژیت و عفونت مجرای ادراری) ارگانیسم مسئول ایجاد عفونت همراه با سایر ارگانیسم‌هایی که قسمتی از جمعیت فلور طبیعی آن محل هستند، حضور دارند. محیطهای زیادی ساخته شده‌اند که رشد میکروب‌هایی که به طور طبیعی حضور دارند را سرکوب می‌کنند و شناسایی ارگانیسم‌های مهم بالینی را آسانتر می‌نمایند. سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی بیمار ممکن است پاتوژن را سرکوب کند بنابراین به تکنیک‌های کشت با حساسیت بالا، به فراوانی نیاز است. همینطور، بعضی عفونت‌ها توسط حضور تعداد نسبتاً کمی ارگانیسم‌ها مشخص می‌شوند، برای مثال، اغلب بیماران سپتیک کمتر از یک ارگانیسم در هر میلی لیتر خون دارند. بنابراین جهت جداسازی این ارگانیسم‌ها در کشت‌های خون قدیمی، نیاز به تلقیح حجم زیادی خون در داخل محیطهای مایع غنی‌شده، می‌باشد. در نهایت کیفیت محیطها باید به دقت بررسی شود تا نشان دهد که آیا آن‌ها همانطوری که طراحی شده‌اند کارآیی خواهند داشت.

تعداد نسبتاً کمی از آزمایشگاه‌ها، محیطهای کشت را خودشان می‌سازند. اغلب محیطها توسط شرکت‌های تجاری بزرگ که در زمینه تولید محیطها تخصص دارند، تولید می‌شوند. اگر چه این مسئله مزیت‌های زیادی دارد ولی این بدان معنا است که اغلب محیطهای کشت بصورت تازه تولید نمی‌شوند. اگر چه این موضوع معمولاً مشکلی ایجاد نمی‌کند ولی می‌تواند روی جداسازی برخی ارگانیسم‌های سخت رشد (Fastidious Organisms) (مانند بوردتلا پرتوسیس) اثر بگذارد. بنابراین آزمایشگاه‌هایی که به فراوانی تست‌های پیشرفته انجام می‌دهند، توانایی ساختن تعداد محدودی از محیطهای کشت اختصاصی را دارند. فرمول‌های آبگیری شده اغلب محیطهای کشت در دسترس می‌باشد بنابراین تهیه آن‌ها می‌تواند با حداقل دردسر انجام شود. لطفا جهت کسب اطلاعات بیشتر راجع به تهیه و کنترل کیفی محیطهای کشت به منابع در فهرست مراجعه نمایید.

انواع محیطهای کشت

محیطهای کشت را می‌توان به چهار دسته کلی تقسیم کرد: (۱) محیطهای غیر انتخابی غنی شده، (۲) محیطهای انتخابی، (۳) محیطهای افتراقی، و (۴) محیطهای غیر اختصاصی (جدول ۲-۴). مثال‌هایی از محیطها در زیر خلاصه شده است.

محیط کشت غیر انتخابی غنی شده (Enriched Nonselective Media)

این محیطها برای تقویت رشد اغلب ارگانیسم‌های فاقد نیازهای رشد سخت گیرانه، طراحی شده‌اند. در زیر برخی از محیطهای مورد استفاده رایجتر آورده شده است.

بلاد آگار (Blood Agar): انواع زیادی از محیطهای بلادآگار در آزمایشگاه‌های بالینی استفاده می‌شوند. این محیطها دارای دو ترکیب اصلی می‌باشند: محیط پایه (مانند تریپتیک سوی (Tryptic Soy)، برین هارت انفیوژن (Brain Heart Infusion)، بروسلا بیس (Brucella Base) و خون (مانند خون گوسفند، اسب و خرگوش). برای اینکه طیف ارگانیسم‌هایی که بتوانند در این محیطها رشد کنند را افزایش داد می‌توان مکمل‌های متنوع دیگری اضافه کرد.

شکلات آگار (Chocolate Agar): این یک محیط بلادآگار اصلاح شده است. وقتی که خون یا هموگلوبین به محیط پایه گرم شده اضافه می‌شود به رنگ قهوه‌ای در می‌آید (از اینرو به این نام نامیده می‌شود). این محیط رشد اغلب باکتری‌ها شامل برخی که بر روی محیط بلادآگار رشد نمی‌کنند (مانند هموفیلوس و برخی سویه‌های بیماریزای نایسریا) را تقویت می‌کند.

جدول ۲-۴. انواع محیط‌های کشت

نوع	محیط‌ها (مثال‌ها)	هدف
غیر انتخابی (Nonselective)	بلاد آگار	جداسازی باکتری‌ها و قارچ‌ها
	شکلات آگار	جداسازی باکتری‌ها شامل هموفیلوس و نایسریا گونوره
	مولر هینتون آگار	محیط تست حساسیت باکتریایی
	تایوگلیکولات براث	محیط مایع غنی شده برای باکتری‌های بی‌هوازی
	سابورو دکستروز آگار	جداسازی قارچ‌ها
انتخابی (Selective)، افتراقی (Differential)	مک کانکی آگار	محیط انتخابی برای باکتری‌های گرم منفی، محیط افتراقی برای گونه‌های تخمیرکننده لاکتوز
	مانیتول سالت آگار	محیطی انتخابی برای استافیلوکوکوس‌ها، محیطی افتراقی برای استافیلوکوکوس اورئوس
	گزیلوز لیزین داکسی کولات آگار	محیطی انتخابی و افتراقی برای شیگلا و سالمونلا در کشت‌های روده‌ای
	محیط لووین اشتاین-جانسن	محیط انتخابی برای مایکوباکتریوم
	میدل بروک آگار	محیطی انتخابی برای مایکوباکتریوم
	کروم آگار	محیطی انتخابی و افتراقی برای مخمرها
	آگار کپک مهاری	محیط انتخابی برای کپک‌ها
اختصاصی (Specialized)	آگار عصاره مخمر شارکول بافری شده (Bhffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar)	جداسازی لژیونلا و نوکاردیا
	سیستئین تلوریت آگار (Cystine-tellurite Agar)	جداسازی کورینه باکتریوم دیفتریه
	لیم براث (Lim Broth)	جداسازی استرپتوکوکوس آگالاکتیه
	مک کانکی سوربیتول آگار (MacConkey SorbitolAgar)	جداسازی اشریشیاکلی O157
	رگان لووه آگار (Regan Lowe Agar)	جداسازی بوردتلا پرتوسیس
	تیوسولفات سیترات بایل سالت سوکروز آگار (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) Agar)	جداسازی گونه‌های ویبریو

مولر هینتون آگار (Mueller-Hinton Agar):

این محیط پیشنهاد شده برای بررسی روتین حساسیت (Susceptibility) باکتری‌ها می‌باشد. این محیط دارای یک ترکیب به خوبی شناخته شده از گوشت گوساله، عصاره‌های کازئین (Casein Extracts)، نمک‌ها، کاتیون‌های دو ظرفیتی و نشاسته قابل حل (Soluble Starch) که برای تکرارپذیری نتایج تست ضروری است، می‌باشد.

تایوگلیکولات براث (Thioglycolate Broth):

یکی از انواع محیط‌های غنی شده است که برای جداسازی تعداد کم باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی بکار می‌رود. فرمول‌های متعددی از این محیط کشت استفاده می‌شود ولی اغلب آن‌ها حاوی هضم کازئین (Casein Digest)، گلوگز، عصاره مخمر، سیستئین و تایوگلیکولات سدیم (Sodium Thioglycolate) می‌باشد. در صورتی که همین

(Hemin) و ویتامین K (Vitamin K) اضافه گردد برای یافتن باکتری‌های بی‌هوازی غنی خواهد شد.

سابورو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar): این یک محیط غنی شده متشکل از هضم‌های کازئین و بافت حیوانی می‌باشد که گلوکز به آن اضافه شده است. این محیط برای جداسازی قارچ‌ها استفاده می‌شود. فرمول‌های متعددی برای این محیط کشت طراحی شده است، امّا اغلب قارچ شناسان از فرمول‌هایی با غلظت کم گلوگز و pH خنثی استفاده می‌کنند. با کاهش دادن pH و اضافه کردن آنتی بیوتیک‌ها از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌شود. این محیط می‌تواند برای قارچ‌ها یک محیط انتخابی باشد.

محیط‌های انتخابی (Selective Media) و محیط‌های افتراقی (Differential Media)

محیط‌های انتخابی برای جداسازی ارگانیسم‌های خاص که ممکن است در مخلوطی از ارگانیسم‌های دیگر حضور داشته باشد (مانند یک پاتوژن روده ای در مدفوع) بکار می‌رود. محیط‌ها با مهارکننده‌هایی که رشد ارگانیسم‌های ناخواسته را سرکوب می‌کنند تقویت می‌شوند. این محیط‌ها را می‌توان با اضافه کردن ترکیبات خاص که امکان شناسایی یک ارگانیسم را در مخلوطی از ارگانیسم‌ها فراهم می‌آورد، افتراقی کرد (مانند اضافه کردن لاکتوز و شاخص pH برای شناسایی باکتری‌های تخمیرکننده لاکتوز). مواد زیر برخی مثال‌ها از محیط‌های انتخابی و افتراقی می‌باشند:

مک کانکی آگار (MacConkey Agar): این یک آگار انتخابی برای باکتری‌های گرم منفی و یک محیط افتراقی جهت افتراق باکتری‌های تخمیرکننده لاکتوز و غیر تخمیرکننده لاکتوز می‌باشد. محیط از هضم‌های پپتون، نمک‌های صفراوی (Bile Salts)، لاکتوز، قرمز خنثی (Neutral Red) و کریستال ویوله (Crystal Violet) تشکیل شده است. نمک‌های صفراوی و کریستال ویوله باکتری‌های گرم مثبت را مهار می‌کنند. باکتری‌های تخمیرکننده لاکتوز اسید تولید می‌کنند که باعث رسوب نمک‌های صفراوی و ایجاد رنگ قرمز در حضور اندیکاتور نوترال رد (Neutral red) می‌شود.

مانیتول سالت آگار (Mannitol Salt Agar): یک محیط انتخابی مورد استفاده برای جداسازی استافیلوکوکوس‌ها می‌باشد. محیط از هضم‌های کازئین، بافت حیوانی، عصاره گوشت گوساله (Beef Extract)، مانیتول، نمک‌ها و فنل رد (Phenol Red) تشکیل شده است. استافیلوکوکوس‌ها می‌توانند در حضور غلظت بالای نمک رشد کنند و استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند مانیتول را تخمیر نموده و کلونی‌هایی با رنگ زرد روی این آگار تولید می‌کند.

گزیلوز لیزین دئوکسی کولات (Xylose-Lysine Deoxycholate (XLD) Agar): این یک آگار انتخابی برای شناسایی سالمونلا و شیگلا در کشت‌های روده‌ای می‌باشد. این یک مثال از رویکرد بسیار هوشمندانه برای شناسایی باکتری‌های مهم در میان مخلوطی از باکتری‌های بی اهمیت است. محیط از عصاره مخمر با گزیلوز، لیزین، لاکتوز، ساکارز، داکسی کولات سدیم، تیوسولفات سدیم (Sodium Thiosulfate)، سیترات آمونیوم آهن (Ferric Ammonium Citrate) و فنل رد تشکیل شده است. داکسی کولات سدیم رشد اکثر باکتری‌های غیر پاتوژن را مهار می‌کند. آن‌هایی که لاکتوز، گزیلوز و یا لیزین را تخمیر می‌کنند کلونی‌های زرد تولید می‌کنند. شیگلا این کربوهیدارت‌ها را تخمیر نمی‌کند بنابراین کلونی‌های قرمز دیده می‌شوند. سالمونلا، گزیلوز (Xylose) و همچنین لیزین دکربوکسیلات‌ها (Decarboxylates Lysine) را تخمیر می‌کند و یک محصول دی آمین قلیایی بنام کاداورین (Cadaverine) تولید می‌نماید. این ترکیب محصولات تخمیر اسیدی را خنثی می‌نماید از اینرو کلونی‌ها قرمز دیده می‌شوند. از آنجایی که اغلب سالمونلاها از تیوسولفات سدیم، سولفید هیدروژن تولید می‌نمایند کلونی‌ها در حضور سیترات آمونیوم فریک به رنگ سیاه درمی‌آیند و بدین صورت سالمونلا و شیگلا از هم افتراق داده می‌شوند.

محیط لووین اشتاین-جانسن (Lowenstein-Jensen (LJ) Medium): این محیط برای جداسازی مایکوباکتریوم‌ها استفاده می‌شود. حاوی گلیسرول، پودر

سیب‌زمینی (Potato Flour) و تخم مرغ‌های کامل منعقد شده (coagulated whole eggs) (برای جامد کردن محیط) می‌باشد. مالاشیت گرین (Malachite Green) جهت مهار باکتری‌های گرم مثبت اضافه می‌گردد.

میدل بروک آگار (Middlebrook agar): این محیط آگار نیز برای جداسازی مایکوباکتریوم‌ها استفاده می‌شود و حاوی مواد مغذی مورد نیاز برای رشد این باکتری (یعنی نمک‌ها، ویتامین‌ها، اسید اولئیک (Oleic Acid)، آلبومین (Albumin)، کاتالاز (Catalase)، گلیسرول (Glycerol) و گلوگز) و مالاشیت گرین جهت مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. در مقایسه با محیط LJ، این محیط با استفاده از آگار جامد می‌شود.

کروم آگار (CHROMagar): یک محیط انتخابی، افتراقی است که برای جداسازی و شناسایی انواعی از باکتری‌ها (مانند استافیلوکوکوس اورئوس، باکتری‌های روده‌ای) و مخمرها به کار می‌رود. مثالی از طراحی این محیط‌ها موردی است که برای گونه‌های کاندیدا تولید شده است. این محیط حاوی کلرامفنیکل جهت مهار رشد باکتری‌ها و مخلوطی از سوبستراهای کروموژنیک اختصاصی می‌باشد. گونه‌های مختلف کاندیدا آنزیم‌هایی دارند که می‌توانند از یک یا تعداد بیشتری از این سوبستراها استفاده کرده و ترکیبات رنگی آزاد کنند و کلونی‌های رنگی ایجاد نمایند. بنابراین کاندیدا آلبیکنس کلونی سبز، کاندیدا تروپیکالیس کلونی ارغوانی و کاندیدا کروزی کلونی صورتی ایجاد می‌کند.

آگار کپک مهاری (Inhibitory Mold Agar): این محیط یک فرمولاسیون غنی شده انتخابی است که برای جداسازی قارچ‌های پاتوژن از درماتوفیت‌ها بکار می‌رود. کلرامفنیکل برای مهار رشد باکتری‌های آلوده‌کننده به محیط اضافه شده است.

محیط‌های اختصاصی (Specialized Media)

انواع زیادی از محیط‌های اختصاصی برای شناسایی ارگانیسم‌های خاص ساخته شده‌اند که این ارگانیسم‌ها ممکن است سخت رشد باشند یا در مخلوطی از ارگانیسم‌های دیگر حضور داشته باشد. محیط‌های مورد استفاده رایجتر مورد استفاده در این کتاب در فصل‌های مربوط به هر ارگانیسم توضیح داده شده است.

کشت سلول (Cell Culture)

برخی باکتری‌ها و تمام ویروس‌ها میکروب‌های درون سلولی اجباری (strict intracellular microbes) هستند و این بدان معنی است که این میکروب‌ها فقط در درون سلول‌های زنده می‌توانند رشد کنند. در سال ۱۹۴۹ جون فرانکلین اندرز (Enders) روشی را برای کشت دادن سلول‌های پستانداران جهت جداسازی پولیو ویروس شرح داد. این روش برای رشد اغلب ارگانیسم‌های درون سلولی اجباری بکار برده شد. کشت‌های سلولی یا می‌توانند به صورت رشد و تقسیم سلول‌ها روی یک سطح باشند (یعنی سلول تک‌لایه) یا به صورت رشد معلق شده در مایع باشد. برخی از کشت‌های سلولی به خوبی پایدار هستند و می‌توان آن‌ها را به مدت نامعینی نگهداری کرد. این کشت‌ها معمولاً به صورت تجاری در دسترس می‌باشند. سایر محیط‌های کشت باید بلافاصله قبل از اینکه با باکتری یا ویروس عفونی شوند آماده شوند و نمی‌توان آن‌ها را در آزمایشگاه برای بیشتر از چند سیکل تقسیم (کشت‌های سلولی اولیه) نگهداری کرد. ورود به درون سلول مرتباً به وسیله وجود رسپتورهای اختصاصی تنظیم می‌شود، بنابراین، توانایی افتراقی در آلوده کردن رده‌های سلولی خاص می‌تواند برای شناسایی باکتری‌ها و ویروس‌ها مورد استفاده قرار گیرد. اطلاعات تکمیلی راجع به استفاده از کشت‌های سلولی در فصل‌های بعد آورده شده است.

سؤال‌ها

۱. اهداف استفاده از میکروسکوپ زمینه روشن، دارک فیلد، فازکنتراست، فلورسنت و الکترونی را توضیح داده و مثالی بزنید که در آن هر روش شرح داده شود؟

۲. مثال‌هایی برای بررسی مستقیم میکروسکوپی، رنگ‌آمیزی افتراقی، رنگ‌آمیزی اسید فست و رنگ‌آمیزی فلورسنت بزنید؟

۳. سه فاکتور که بر موفقیت کشت اثر می‌گذارند نام ببرید.

۴. سه مثال برای محیط‌های غنی شده غیر انتخابی بیاورید.

۵. سه مثال برای محیط‌های انتخابی، افتراقی بزنید.

پاسخ‌ها

۱. در **میکروسکوپ نوری**، نور مرئی از کندانسور و سپس شیئی که قرار است دیده شود، عبور می‌کند. در نهایت از یک سری لنزها عبور کرده و تصویر بزرگ می‌شود. این روش شایع‌ترین تکنیک مورد استفاده برای بررسی نمونه‌هایی است که روی اسلاید شیشه‌ای قرار می‌گیرند. در **میکروسکوپ دارک فیلد،** از همان لنزهایی استفاده می‌شود که در میکروسکوپ نوری استفاده می‌شود ولی در میکروسکوپ دارک فیلد یک کندانسور خاص وجود دارد که با زاویه حاده قرار گرفته است که باعث می‌شود زمینه تاریک و شیء مورد نظر روشن دیده شود. از این میکروسکوپ برای دیدن باکتری‌های بسیار باریک (مانند ترپونما پالیدوم) استفاده می‌شود. **میکروسکوپ فازکنتراست،** اجسام را به وسیله عبور پرتوهای موازی نور نشان می‌دهد. این پرتوها از فازهای مرتبط با هم خارج می‌شوند و بدین ترتیب اجازه دیدن تصاویر سه بعدی را می‌دهد و برای دیدن ساختارهای درونی مفید است. در **میکروسکوپ فلورسنت** برای نشان دادن تصویر از لامپ‌های بخار جیوه، زنون و هالوژن با فشار بالا به منظور حذف طول موج‌های کوتاه استفاده می‌شود. یک سری از فیلترها برای مهار گرما و نور مادون قرمز و انتخاب طول موج نور مناسب (مانند لژیونلا) و ارگانیسم‌هایی که با رنگ‌های فلورسنت رنگ شده‌اند (مانند مایکوباکتریوم) مفید است.

۲. روش‌های بررسی مستقیم آزمایشگاهی شامل معلق کردن نمونه در آب (مانند گسترش مرطوب برای قارچ‌ها) و یا استفاده از رنگ‌های متضاد (مانند لاکتوفنول کاتن بلو برای قارچ‌ها یا ید برای انگل‌ها) می‌باشد. رنگ‌های افتراقی برای ردیابی باکتری‌ها (مانند رنگ‌آمیزی گرم و اسید فست)، انگل‌ها (مانند رنگ‌آمیزی تری‌کروم و هماتوکسیلین آهن) و پاتوژن‌های انتقال‌یابنده از طریق خون (مانند گیسما برای بورلیا و پلاسمودیوم) به کار می‌رود. روش‌های متنوع رنگ‌آمیزی اسید فست وجود دارد (مانند زیل نلسون، کینیون و فلوروکروم) که برای ردیابی باکتری‌ها (مایکوباکتریوم، نوکاردیا و رودوکوکوس) و انگل‌ها (کریپتوسپوریدیوم، سیکلوسپورا و ایزوسپورا) به کار می‌رود. رنگ‌های فلورسنت معمولاً برای ردیابی قارچ‌ها (رنگ کالکوفلور سفید) و ارگانیسم‌های اسید فست (رنگ اورامین رودامین) استفاده می‌شود.

۳. بیولوژی ارگانیسم (اینکه آیا ارگانیسم نیازهای رشد ویژه‌ای دارند یا اینکه به افزودنی‌ها و فاکتورهای رشد نیاز دارند یا خیر)، محل عفونت (آیا می‌توان از محل عفونت نمونه‌برداری کرد یا خیر)، پاسخ ایمنی میزبان به عفونت (اینکه آیا ارگانیسم به وسیله پاسخ ایمنی میزبان غیرفعال می‌شود و یا از بین می‌رود)، کیفیت محیط کشت.

۴. بلاداگار، شکلات آگار، تایوگلیکولات براث.

۵. مک‌کانکی آگار، مانیتول سالت آگار، گزیلوز لیزین دئوکسی کولات آگار

فصل
۵

تشخیص مولکولی

شـبیه مدارکی که در صحنه یک جنایت باقی می‌ماند DNA (دزوکسی ریبونوکلئیک اسید) و RNA (ریبونوکلئیک اسـید) یا پروتئین‌های یک عامل عفونی در نمونه کلینیکی می‌توانـد جهت کمک در شناسـایی آن عامل به کار برده شوند. در موارد زیادی عامل عفونی را حتی اگر نتوان توسط روش‌های ایمونولوژیکی جداسـازی و شناسایی نمود ولی توسـط این روش می‌توان آن‌ها را ردیابی و شناسایی کرد. علاوه بر این تکنیک‌های ملکولی از قبیل توالی یابی اسید نوکلئیک و آنالیز پروتئینی توسـط اسـپکترومتری جرمی به سـرعت جایگزین روش‌های قدیمی از قبیل تست‌های بیوشیمیایی، جهت شناسایی باکتری‌ها و قارچ‌های جدا شده در کشت می‌شوند.

موضـوع اصلـی در این فصل معمـولا در کتاب‌های مفهومی ارایه شـده اسـت بنابراین این فصل فقط مروری اجمالی بر روش‌ها و کاربردهای تشخیص‌های ملکولی دارد. روش‌ها از تکنیک‌ها برای شناسـایی اسـیدهای نوکلئیک میکروبی و پروتئین‌ها یا تشـخیص میکروب‌ها اسـتفاده می‌کننـد. شناسـایی میکروب‌ها (ویروس‌هـا، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها) عمدتا به صورت مسـتقیم با نمونه‌های بالینی انجام می‌شـود در حالی که شناسـایی و تشخیص می‌تواند از نمونه‌های بالینی یا ارگانیسم جدا شده در کشت باشد.

مثال‌هایی در استفاده تست‌های تشخیصی ملکولی در جدول ۱-۵ خلاصه شده‌اند.

پروب‌های غیر تکثیر شده اسید نوکلئیک

اولیگـو نوکلئوتیدهای DNA یـا RNA (معمولاً طول آن کمتر از ۵۰ نوکلئوتید اسـت) نشاندار شده با ملکول‌های سیگنال گزارشگر که به توالی‌های اسید نوکلئیک میکروبی مکمل خاص متصل می‌شـود تا ارگانیسم را در نمونه بالینی شناسایی کند یا برای شناسایی ارگانیسم جدا شده در کشت اسـتفاده می‌شود. تعداد زیادی توالی هدف این پروب‌ها باید وجود داشته باشـند تا مفید واقع شوند. معمولا این‌ها برای شناسایی مسـتقیم ارگانیسم‌ها در نمونه‌های بالینی استفاده نمی‌شـوند زیرا حساسیت تسـت خیلی پایین است (یعنی ارگانیسم‌های بسیار اندکی برای شناسایی واقعی وجود دارند). از این رو آن‌ها می‌توانند برای شناسـایی ارگانیسم‌های جدا شده در کشت از قبیل مایکو باکتریوم‌ها، قارچ‌های دو شکلی و ویروس‌ها استفاده شـوند زیرا تعداد زیادی از ارگانیسم‌ها وجود خواهند داشت. استفاده دیگر پروب‌های ملکولی برای شناسایی توالی‌های خاص تکثیر یافته توسط روش‌هایی که در این فصل لیست شده‌اند می‌باشد.

روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک

هم اکنون روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک (NAA) به طور وسیع در آزمایشگاه‌های بالینی برای شناسایی مستقیم پاتوژن‌ها در نمونه‌های بالینی اسـتفاده می‌شوند. انواعی از روش‌های NAA توسـعه پیدا کرده‌اند اما تنها چهار روشی که به طور متداول اسـتفاده می‌شوند در این جا شرح داده خواهند شد: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، اصلاحات PCR، تکثیر به واسـطه نسـخه بـرداری (TMA)، تکثیر جایگزین رشته (SDA)، و تکثیر به واسطه لوپ (LAMP).

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

DNA پلی مراز جهت سـنتز توالی اختصاصی DNA میکروبی (توالی هدف) اسـتفاده می‌شود. دو پرایمر اولیگو نوکلئوتیدی به رشـته DNA دو رشـته‌ای متصل شده و با القـای توالی مکمـل DNA توالی‌یابی صـورت می‌گیرد. تکثیر به وسـیله گرم کردن DNA به منظور باز نمودن دو

جدول ۱-۵ مثال‌هایی از کاربردهای تست‌های تشخیصی ملکولی

تست	آزمایش ملکولی	تشخیص جایگزین
تست‌های HAI	MRSA,MSSA	کشت حساس‌تر است اما آهسته‌تر می‌باشد.
	کلستریدیوم دیسیل	ایمونواسی پیشنهاد می‌شود اما غیر حساس است، تست معکوس انتخابی است.
	باکتری‌های گرم منفی مقاوم به کارباپنم	کشت حساس‌تر است اما آهسته‌تر می‌باشد.
تست‌های سلامت باروری	کلامیدما تراکوماتیس	کشت بافت یا سرولوژی، تست ملکولی انتخابی است.
	نایسریا گونوره	کشت، تست ملکولی انتخابی است.
	تریکوموناس واژینالیس	کشت یا میکروسکوپی، تست ملکولی انتخابی است.
	استرپتوکوک گروه B	کشت، تست ملکولی انتخابی است.
	واژینیت باکتریایی	میکروسکوپی، تست ملکولی انتخابی است.
پنل‌های مولتی پلکس ملکولی	عفونت‌های تنفسی (باکتری‌ها، ویروس‌ها)	کشت یا ایمونواسی برای ویروس‌ها و باکتری‌های خاص، برای اغلب عوامل تست ملکولی انتخابی است.
	عفونت‌های روده‌ای (باکتری‌ها، ویروس‌ها، انگل‌ها)	کشت یا ایمونواسی‌ها برای باکتری‌های خاص، ایمونواسی برای ویروس‌های خاص، تست ملکولی برای اغلب عوامل انتخابی است.
	کشت خون مثبت (باکتری‌ها، مخمرها)	ID سریع توسط MALDI، تست‌های ملکولی تکمیل کننده کشت هستند (به جایگزین)
	مننژیت (باکتری‌ها، ویروس‌ها)	برای ویروس‌ها جایگزینی وجود ندارد، تکمیل کننده کشت در باکتری‌ها است. (نه جایگزین)
تست‌های ویروسی بر پایه خون	HIV	ایمونواسی، تست ملکولی انتخابی است.
	ویروس‌های هپاتیت (C,B,A)	ایمونواسی، تست ملکولی انتخابی است.
	HPV	سایتولوژی، تست ملکولی انتخابی است.
	ویروس‌های طبقه بندی نشده	تست ملکولی انتخابی است.
تست‌های طبقه‌بندی نشده	مایکوباستریوم توبرکلوزیس	کشت و یا میکروسکوپی
	استرپتوکوک گروه A	جایگزین‌های ایمونواسی‌ها یا کشت

HAI، عفونت اکتسابی از بیمارستان؛ HIV، ویروس نقص ایمنی انسان؛ HPV ، ویروس پاپیلومای انسانی؛ Matrix-assisted Laser Desorption Ionization، MSSA, استافیلوکوک اورئوس حساس به متی‌سیلین؛ MRSA؛ استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین.

رشته DNA اتفاق می‌افتد، سرد کردن واکنش به پرایمر اجازه می‌دهد که به دو رشته DNA متصل شوند، سپس طویل نمودن توالی‌ها از پرایمرها به وسیله آنزیم DNA پلی‌مراز ایجاد می‌شود. این چرخه گرم کردن، سرد کردن و پلی‌میرازسیون از طریق تعدادی سیکل پیش می‌رود. در هر لحظه به صورت بالقوه تعداد کپی‌های DNA هدف در حال افزایش است (شکل ۱-۵). PCR متداول‌ترین تکنیک NAA است که در آزمایشگاه‌های بالینی برای شناسایی پاتوژن‌ها در نمونه‌های بالینی استفاده می‌شود. همچنین تعدادی انواع PCR وجود دارد. PCR ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR) برای تکثیر RNA اهداف توسعه پیدا کرده است. Nested PCR حساسیت PCR را با انجام دو واکنش تکثیر متوالی با استفاده از دو جفت پرایمر و واکنش‌های PCR افزایش می‌دهد. اولین جفت پرایمرهای تکثیر PCR مرسوم استفاده می‌شود. دومین جفت پرایمر یک توالی داخلی از محصول واکنش اول را تکثیر می‌دهد. این فرایند حساسیت و اختصاصیت تکثیر PCR را افزایش می‌دهد. **مولتی پلکس PCR** از چندین جفت پرایمر برای

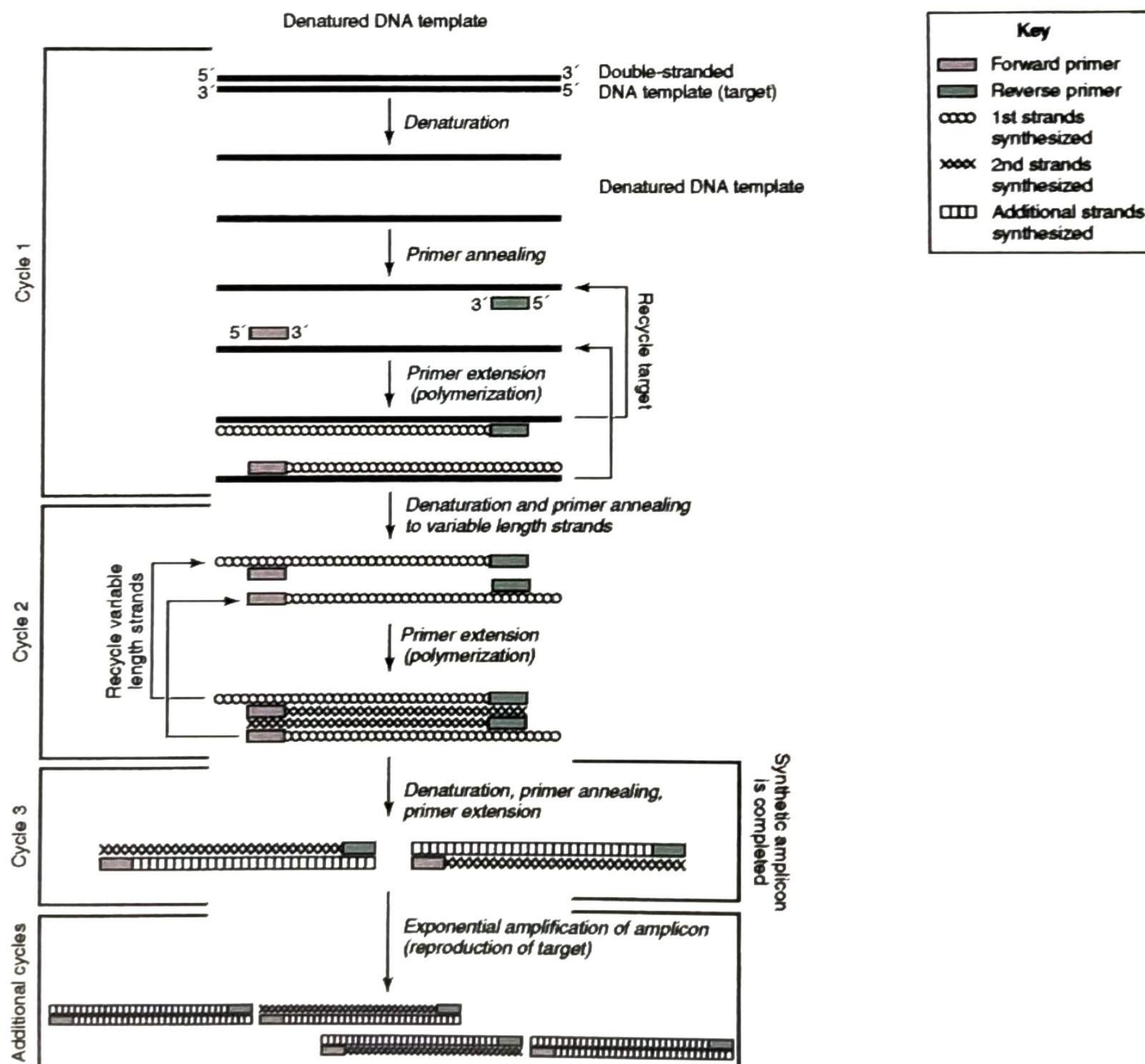
تکثیر چندین هدف ژنی به صورت همزمان استفاده می‌کند. Real- time PCR امکان تکثیر تولی اسید نوکلئیک هدف و امکان شناسایی همزمان محصول تکثیر را فراهم ساخته و زمان شناسایی واکنش مثبت را کاهش می‌دهد.

تکثیر به واسطه رونویسی

TMA یک روش ایزوترمال تکثیر RNA است (در یک دمای ثابت انجام می‌شود). RNA هدف به DNA مکمل (CDNA) نسخه‌برداری و سپس کپی‌های RNA با استفاده از RNA پلی مراز نسخه برداری می‌شود (شکل ۲-۵). مزیت‌های TMA شامل کنتیک‌های سریع، عدم نیاز به گرم کردن و سرد کردن با استفاده از ترموسایکلر، عدم نیاز به دناچوره شدن RNA تک رشته‌ای محصول قبل از شناسایی می‌باشند. عیب این تکنیک آن است که با اهداف DNA عملکرد نسبتاً ضعیفی دارد.

تکثیر جایگزین رشته

SDA یک روش تکثیر ایزوترمال برای شناسایی توالی‌های اختصاصی RNA و DNA است (شکل ۳-۵). DNA هدف دو رشته‌ای (یا هیبرید DNA - RNA) دناچوره شده و سپس به دو جهت پرایمر هیبرید می‌شود. جفت پرایمر تکثیر در '۵ توالی هدف هیبرید می‌شود. و دارای یک توالی اندونوکلئاز محدود می‌باشد. جفت پرایمر دوم فقط به خارج از انتهای '۳ توالی هدف متصل می‌گردد. توالی‌های مکمل به صورت همزمان طویل می‌شوند و کپی‌های دو رشته‌ای از توالی هدف اندونوکلئاز یک برش

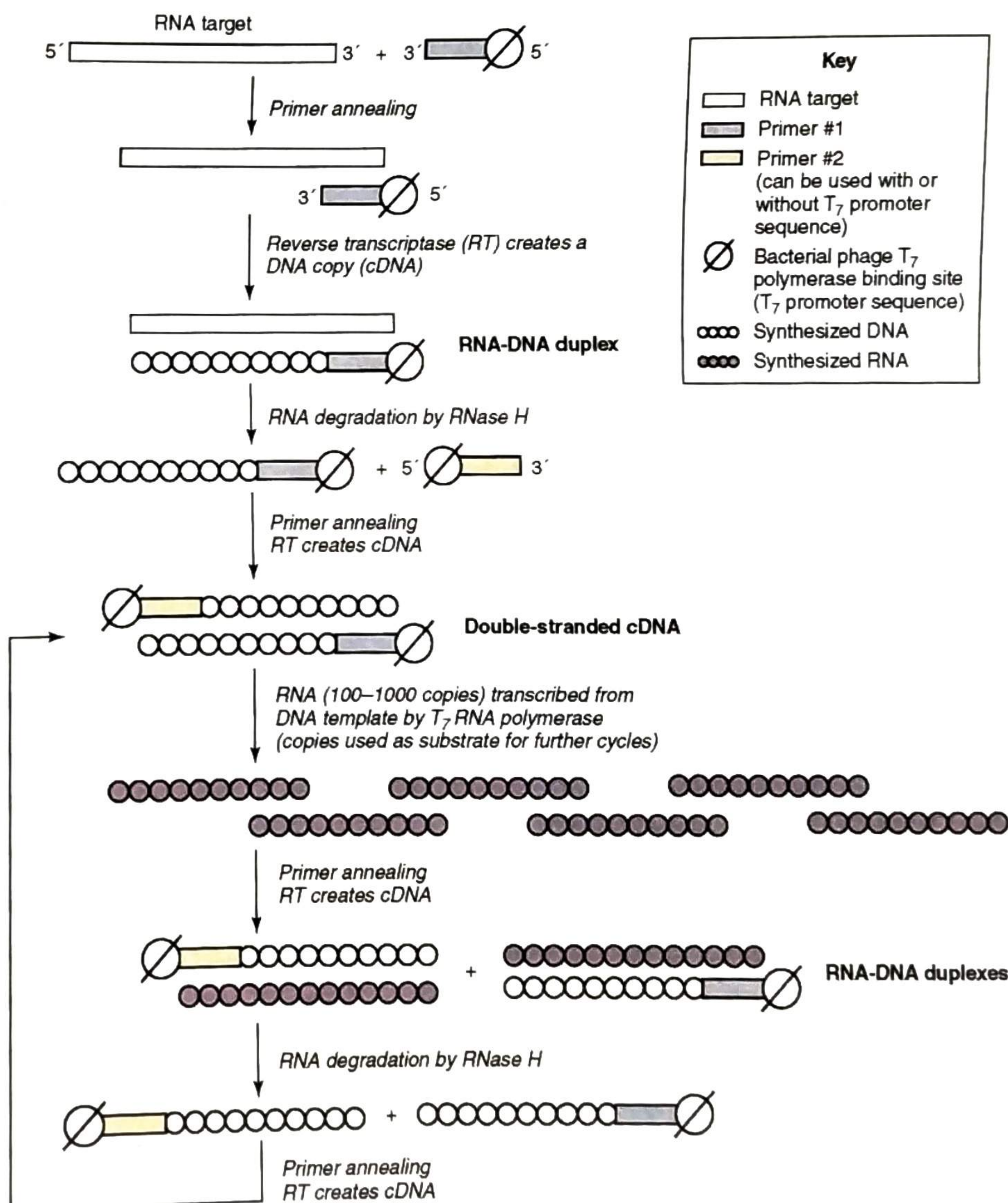


شکل ۱-۵ تکثیر هدف واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

در انتهـــای '۵ ایجاد می‌کند. تکثیر هــدف اتفاق می‌افتد و ســپس DNA پلی مراز به محل برش متصل شده و رشته جدید را سنتز می‌کند در حالی که رشته پایین دست، جابجا می‌شــود. تکرارهای این فرایند تکثیر بالقوه توالی هدف را ســبب می‌شود این تکثیر ایزوترمال حساسیت بسیار بالایی دارد اما هیبریداســیون پرایمر غیــر اختصاصی می‌تواند در مخلوط کمپلکس ارگانیسم‌ها رخ دهد.

تکثیر به واسطه حلقه

LAMP نوعی ایزوترمال از SDA بوده که با استفاده از چهار تا شش جفت پرایمر توالی DNA و RNA هدف تکثیر می‌یابند محصولات تکثیر داده شــده به وسیله اندازه‌گیری کدورت رســوب منیزیوم پیروفســفات تولید شده در طی واکنش تکثیر به صورت همزمان ارزیابی می‌شود. این روش تکثیر به ویژه جذاب است زیرا سریع بوده و نیاز به تجهیزات گران قیمت می‌باشد.



شکل ۲-۵ تکثیر هدف بر پایه رونویسی

آنالیز اسید نوکلئیک

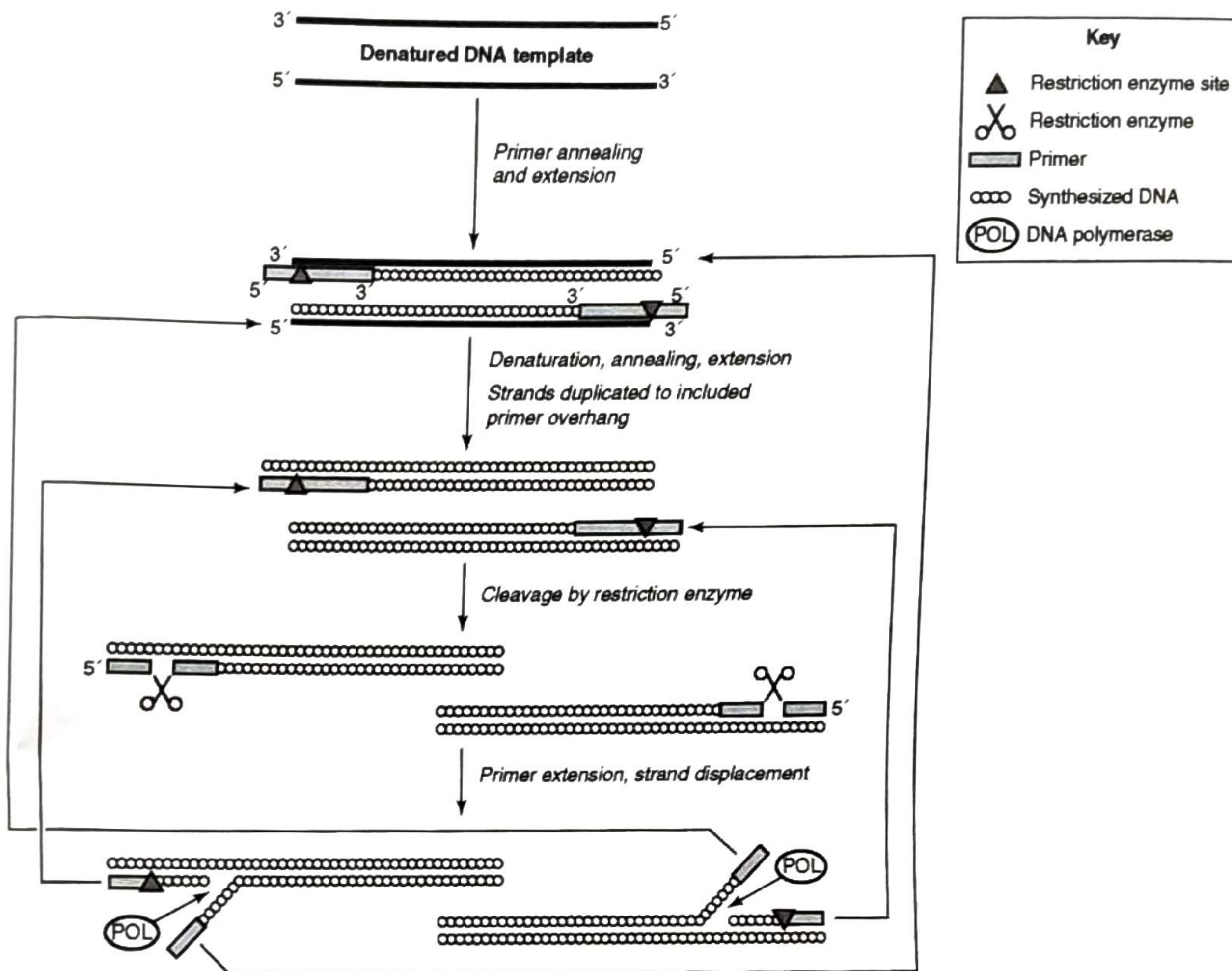
بسیار شبیه حروف، کلمات، جملات و پاراگراف‌های یک کتاب؛ توالی‌های اسیدهای نوکلئیک در DNA و RNA داستانی درباره توانایی‌های ژنتیکی ارگانیسم جدا شده می‌گویند. در بالاترین سطح توالی DNA یا RNA می‌تواند انتخاب شده که برای شناسایی ارگانیسم در سطح جنس یا گونه یا مشخص کردن ژن کد کننده مارکر بیماریزا یا مقاومت آنتی بیوتیکی استفاده می‌شود. در سطح عمیق‌تر توالی‌های DNA می‌تواند برای ساب تایپ کردن ارگانیسم برای اهداف اپیدمیولوژیک استفاده شود. در این بخش متداول‌ترین تکنیک‌های مورد استفاده برای شناسایی و ساب تایپ کردن اپیدمیولوژیک ارگانیسم‌ها مورد بحث قرار گرفته اند.

توالی یابی اسیدنوکلئیک

توالی یابی می‌تواند به توالی‌یابی هدف دار که در آن یک ناحیه اختصاصی DNA یا RAN توالی‌یابی می‌شود و توالی‌یابی تمام ژنوم (WGS) که در آن ژنوم میکروبی توالی‌یابی می‌شود دسته بندی می‌گردد. توالی یابی هدف‌دار عمدتا برای شناسایی ارگانیسم یا شناسایی ژن بیماریزایی یا ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده می‌گردد در حالی که WGS برای ساب تایپینگ یا ژنوتایپینگ ارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. توالی یابی ژن‌های RNA ریبوزومی روش متداول برای شناسایی قطعی باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشد زیرا پروتئین‌های این ژن‌ها بسیار محافظت شده هستند و برای شناسایی در سطح جنس مفید می‌باشند در حالی که سایر توالی‌های ژن‌های RNA ریبوزومی اختصاصی گونه هستند. همین طور مقایسه توالی‌های ژنوم باکتری‌های فرد روشی متداول برای دستیابی به میزان وابستگی است. با هر تکثیر یک یا تعداد بیشتری جهش در ژنوم‌های دودمان باکتریایی اتفاق می‌افتد. از این رو جهش‌های بیشتر (پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتید [SNPs]) که در ژنوم‌ها دیده می‌شود و دارای ارتباط دوری با هم هستند در واقع دو ارگانیسم مختلف می‌باشند. این روش استاندارد برای تحقیقات طغیان‌های عفونی می‌باشد. از این رو حتی با وجودی که یک فرایند WGS شامل قطعات اسیدنوکلئیک طویل و سپس گردهمایی در قالب ژنوم‌های کامل در سال‌های اخیر نسبتا ساده و ارزان می‌باشد اما اغلب آزمایشگاه‌ها هنوز از تجربه‌های تکنیکی برای استفاده از این ابزارها برخوردار نیستند. بدین ترتیب انواعی از سایر روش‌ها برای دسته‌بندی اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرند که متداول‌ترین روش مورد استفاده در این‌جا شرح داده شده است.

پلی‌مورفیسم طول قطعه برش داده شده

سویه‌های خاصی از میکروگارنیسم‌ها (عمدتا باکتری‌ها و ویروس‌ها) را می‌توان بر اساس قطعات DNA تولید شده در نتیجه شکسته شدن قطعه DNA به وسیله اندونوکلئازهای برش دهنده اختصاصی (آنزیم‌های برش دهنده) که توالی‌های اختصاصی DNA را شناسایی می‌کنند افتراق داد. شکسته شدن نمونه‌های DNA مربوط به سویه‌های مختلف توسط آنزیم اندونوکلئاز برش دهنده می‌تواند منجر به تولید قطعاتی با طول‌های بسیار متفاوت شود این الگوی قطعات DNA (پلی‌مورفیسم طول قطعه برش داده شده [RFLP] برای تعیین ارتباط سویه‌های مختلف بکار می‌رود (شکل ۴-۵). قطعات DNA با اندازه‌ها یا ساختارهای متفاوت را می‌توان به وسیله حرکت آن‌ها در طی الکتروفورز در ژل آگارز یا ژل پلی‌آکریل آمید افتراق داد. قطعه DNA از میان یک ساختار شبیه به ماز ژل آگارز در سرعت‌های مختلف حرکت می‌کند که امکان جداسازی آن را فراهم می‌سازد. DNA را می‌توان با وسیله رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده نمود قطعات کوچکتر (کمتر از ۲۰۰۰۰ جفت بار) از قبیل قطعات پلاسمیدهای باکتریایی یا ویروس‌ها را می‌توان توسط روش‌های الکتروفورتیک نرمال جداسازی و افتراق داد. قطعات بزرگتر از قبیل قطعات مربوط به باکتری‌های کامل را می‌توان به وسیله تکنیک الکتروفورتیک خاص تحت عنوان پالس فیدژل الکتروفورز جداسازی کرد. روش این تکنیک شبیه به ژل الکتروفورز استاندارد است به استثنا این که در این جا حرکت قطعات DNA در میان ژل به صورت دوره‌ای تغییر می‌کند. با انجام این روش قطعات بسیار بزرگ DNA می‌توانند (میان ژل حرکت کرده و بر اساس اندازه از هم جدا می‌شوند. RFLP یک روش پر زحمت بوده که قدرت تفکیک آن به



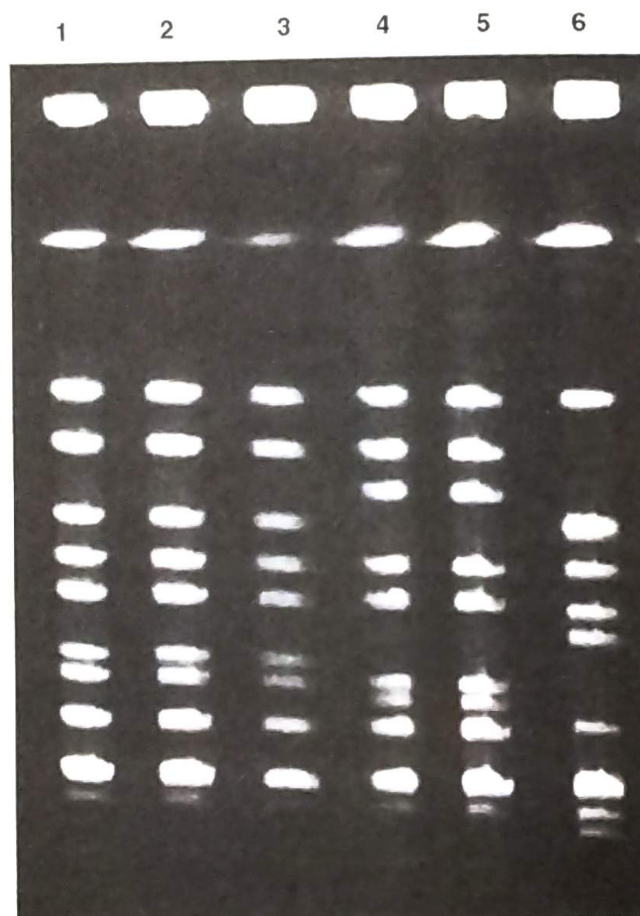
شکل ۳-۵. تکثیر هدف جایگزینی رشته

اندازه روش‌های آنالیز WGS و SNP نمی‌باشد از این رو احتمال دارد که این روش در دهه آینده از دور خارج شود و روش‌های توالی یابی به طور وسیع‌تری در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی بالینی مقبولیت دارند.

آنالیز پروتئین

وسترن بلات

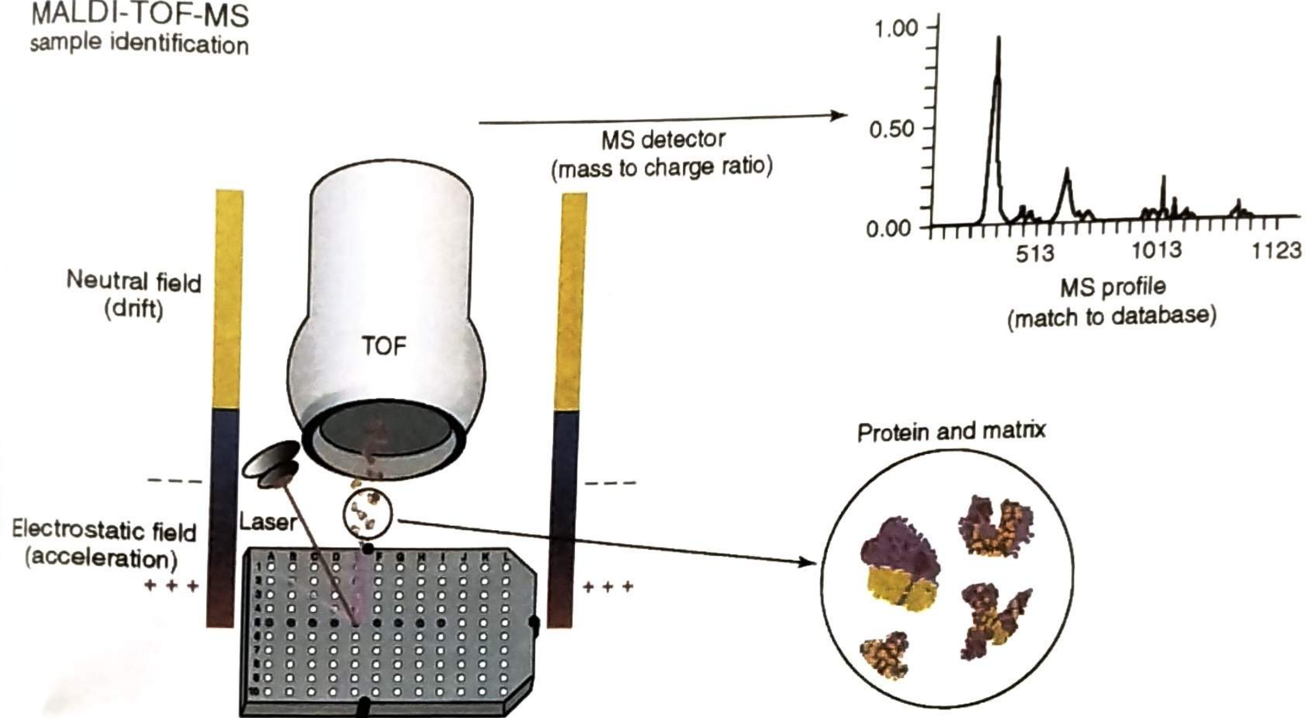
وسترن بلات یا پروتئینی ایمونوبلات تکنیکی است برای شناسایی پروتئین‌های میکروبی اختصاصی یا آنتی‌بادی‌های بیمار علیه پروتئین‌ها. این تکنیک نوعی از ساترن بلات است که توسط ادوین ساترن برای شناسایی DNA ارایه گردید و نوترون بلات برای شناسایی RNA توسعه پیدا کرده است. اگرچه این تکنیک برای اغلب ارگانیسم‌ها به وسیله دیگر تست‌های تشخیصی عفونی جایگزین شده است، اما هنوز برای بیماری‌هایی نظیر بیماری لایم، بیماری کروتز فلد جاکوب مرتبط با پریون و HIV استفاده می‌شود. در مورد بیماری لایم تست و سترن بلات برای تایید نتایج مثبت اولیه ایمونواسی استفاده می‌گردد. پروتئین‌های میکروبی (پروتئین‌های خالص شده یا پروتئین‌های سلول کامل) با یک عامل احیاء کننده قوی دناچوره شده و سپس بر اساس اندازه توسط الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید جداسازی می‌شوند. سپس پروتئین‌ها به وسیله بلاتینگ به یک برگه نیتروسلولزی انتقال داده می‌شوند (برای جلوگیری از واکنش‌های غیر اختصاصی با پروتئین‌های شیر بلاک شده‌اند) و سپس با سرم بیمار پوشانده می‌شود. سپس از اتصال با آنتی‌بادی‌های بیمار نیتروسلولر شسته می‌شود و به منظور شناسایی آنتی‌بادی متصل شده به پروتئین‌های میکروبی اختصاصی رنگ آمیزی می‌شود. الگوی اتصال می‌تواند واکنش‌های اختصاصی با واکنش‌های غیر اختصاصی (یا منفی) را تفکیک نماید.



شکل ۴-۵. تفاوت پیل مورفیسم طول قطعه برش داده شده DNA از سویه‌های باکتریایی جدا شده توسط پاس فیلد ژل الکتروفورز. ردیف‌های شماره ۱ تا ۳ DNA شکسته شده باکتری‌ها توسط اندونوکلئاز برش دهنده SmaI را نشان می‌دهد که از دو عضو یک خانواده مبتلا به فاسیت نکروزان و پزشک آن‌ها (فارنژیت) جدا شده‌اند. ردیف‌های ۴ تا ۶ از سویه‌های استرپتوکوکوس پایوژنز غیر مرتبط می‌باشند.

Matrix- Assisted Laser Desorption/ Ionization- Time of Flignt

به ندرت یک تکنولوژی می‌تواند اساساً روش‌های تست تشخیصی که به خوبی ثبات پیدا کرده‌اند را تغییر دهد اما باید این دقیقاً همان چیزی است که اسپکترومتری جرمی Matrix - Assisted loser Desorpton/ Inization- Time of Flight (MALDI-TBF) انجام داده است. این تکنولوژی امروزه به طور وسیع برای شناسایی باکتری‌ها، مایکوباکتریوم‌ها، مخمرها و کپک‌ها استفاده می‌شود و جایگزین تست‌های بیوشیمی و مورفولوژیک که سنگ بنای میکروبیولوژی تشخیصی برای مدت بیش از ۱۰۰ سال بوده‌اند شده است. دلیل این ترانسفورماسیون آن است که تکنولوژی بسیار صحیح بوده، به لحاظ تکنیکی اجرای آن ساده است و هم چنین سریع و ارزان قیمت می‌باشد. کلونس‌های باکتریایی و مخمر از پلیت‌های کشت آگار برداشته می‌شوند سپس به یک پلیت هدف انتقال داده می‌شود، آن گاه با یک اسید ارگانیک قوی حل می‌شود (مثلاً اسید فرمیک)، سپس با یک ماتریکس جذب کننده اشعه ماوراء بنفش (UV) مخلوط شده و روی پلیت‌های هدف خشک می‌شود (شکل ۵-۵). آماده‌سازی‌ها خشک شده در معرض پالس‌های اشعه لیزر قرار می‌گیرند که در نتیجه آن انرژی از ماتریکس به ملکول‌های غیر فرار پروتئینی انتقال می‌یابد و همراه با دفع (حذف) پروتئین‌ها به داخل فاز گاز می‌باشد. ملکول‌های یونیزه شده به وسیله قدرت الکتریکی از طریق یک کانال نور به اسپکترومترجری شتاب می‌گیرند و جداسازی پروتئین‌ها به وسیله نسبت توده به جذب (Z; m/z به طور تیپیک یک است) تعیین می‌شود و پروتئین‌های کوچکتر خیلی سریع‌تر از پروتئین‌های بزرگتر حرکت می‌کند. پروفایل پروتئین‌ها با پروفایل ارگانیسم‌هایی که به خوبی شناسایی شده‌اند مقایسه می‌شود و امکان شناسایی اغلب ارگانیسم‌ها در سطح گونه یا زیر گونه را فراهم می‌سازد. استفاده از MALDI-TOF برای شناسایی سایکو باکتریوم‌ها و قارچ‌ها تنها به جبران اندکی پیچیده‌تر است در نتیجه شناسایی‌های بسیار صحیح در کمتر از یک ساعت اتفاق می‌افتد. انتخاب ماتریکس، بیومارکرهای اختصاصی که شناسایی می‌شوند را تحت تاثیر قرار می‌دهد (مثلاً پروتئین‌ها، فسفولیپیدها (لیپوپپتیدهای حلقوی) به طوری که آلفا- سیانو- ۴- هیدروکسی سینامیک اسید ترجیحا برای شناسایی بیومارکرهای پروتئین استفاده می‌شود. کل فرایند چند دقیقه زمان می‌برد و برابر با شناسایی ارگانیسم‌ها به وسیله توالی یابی صدها ژن می‌باشد زیرا تغییر در تنها یک اسید آمینه پروفایل پروتئینی را تغییر خواهد داد اخیراً کاربردهای MALDI-TOF برای شناسایی مارکرهای پروتئینی برای مقاومت آنتی‌بیوتیک و بیماریزایی و هم چنین شناسایی مستقیم برخی ارگانیسم‌ها در نمونه‌های بالینی توسعه پیدا کرده است.



شکل ۵-۵. شناسایی میکروارگانیسم به وسیله اسپکترومتری جرمی Matrix- Assisted Laser Desorption Ionization- time of flight (mALDI-TOF).

سؤال‌ها

کدام روش‌ها می‌تواند برای آنالیز مثال‌های ذکرشده استفاده شود و چرا آن روش باید استفاده گردد؟

۱. مقایسه باکتری‌های اصلی که در فلورنرمال یک فرد چاق و یک فرد لاغر وجود دارند.

۲. مقایسه باکتری‌های نرمال فلورایی که در ارتباط با آبسه‌های مزمن دهانی هستند.

۳. یک فرد ۳۷ ساله دارای علایم شبه آنفلوآنزاست که احتمالاً یک عفونت ویروسی است. برای شناسایی عامل این بیماری به نمونه شستشوی بینی نیاز است.

۴. کاربرد درمان ضد رتروویروس در یک فرد مبتلا به عفونت HIV می‌تواند از طریق بررسی تعداد ژنوم‌های ویروسی در خون فرد بررسی شود.

۵. یک پاپ اسمیر مشکوک به عفونت پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) وجود دارد – چگونه می‌توان HPV را شناسایی کرد.

۶. یک نوزاد با عارضه میکروسفالی به دنیا آمده است. شک بر روی CMV وجود دارد. ادرار، حاوی سلول‌هایی با مشخصات مورفولوژیکی عفونت CMV است. چگونه می‌توان عفونت CMV را تأیید کرد.

۷. مقاومت ضدویروسی و شدت بیماری برای هپاتیت C جداشده از یک فرد استفاده‌کننده از داروی تزریقی آنالیز شده است.

پاسخ‌ها

۱. ژن 16SrRNA توسط PCR و با استفاده از پرایمرهای عمومی (universal primers) که گروه بزرگی از باکتری‌ها را شناسایی می‌کنند تکثیر می‌یابد. سپس توالی اختصاصی در درون ژن تکثیر و توالی‌یابی می‌شود و بدین صورت باکتری و سویه آن مشخص می‌شود.

۲. ژن 16SrRNA توسط PCR و با استفاده از پرایمرهای عمومی (universal primers) که گروه بزرگی از باکتری‌ها را شناسایی می‌کنند تکثیر می‌یابد. سپس توالی اختصاصی در درون ژن تکثیر و توالی‌یابی می‌شود و بدین صورت باکتری و سویه آن مشخص می‌شود.

۳. RNA از نمونه جدا می‌شود و توسط ترانس کریپتاز معکوس به DNA تبدیل می‌شود و سپس تکثیر می‌یابد (RT-PCR). حضور توالی ویروس خاص سپس می‌تواند توسط PCR و با استفاده از پرایمر خاص ویروسی ردیابی شود.

۴. RT-PCR کمی می‌تواند برای مشخص کردن تعداد کپی‌های ژنوم به کار رود. اگر فرد به طور صحیح درمان را انجام دهد ژن‌های ویروسی مربوطه را می‌توان به منظور تعیین ماهیت موتانت مقاوم توالی‌یابی کرد.

۵. هیبریدیزاسیون درجا می‌تواند برای اثبات وجود HPV DNA در درون سلول‌های پاپ اسمیر به کار رود.

۶. هیبریدیزاسیون درجا می‌تواند برای اثبات وجود توالی‌های CMV DNA در درون سلول‌ها در ادرار به کار رود. PCR همچنین می‌تواند برای شناسایی توالی‌های ویروسی در ادرار یا خون نوزاد استفاده شود.

۷. توالی ژنوم ویروسی می‌تواند برای آنالیز RNA جداشده از خون توسط روش RT-PCR به کار رود. به منظور مشخص کردن اساس مقاومت، ژن‌های هدف اختصاصی می‌توانند متعاقباً تکثیر یابند و توالی‌یابی شوند.

فصل

۶ تشخیص سرولوژیکی

تکنیک‌هـــای ایمونولوژی برای ردیابی، شناســـایی و تعیین مقـــدار آنتـــی‌ژن در نمونه‌های بالینـــی و همچنین ارزیابی پاســـخ آنتی‌بادی به عفونت و ســـابقه‌ای از برخورد فرد با عوامـــل عفونی بکار می‌رونـــد. اختصاصیت واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی و حساســـیت بســـیاری از تکنیک‌های ایمونولوژیکی آن‌ها را به ابزارهای آزمایشگاهی قدرتمندی تبدیل کرده اســـت (جـــدول ۱-۶). در اغلب موارد تکنیک مشابهی می‌تواند برای ارزیابی سنجش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی بکار رود. از آنجایی که بســـیاری از آزمون‌های سرولوژیک برای بدســـت آوردن نتایج مثبت و منفی طراحی شـــده‌اند میـــزان توانایی آنتی‌بـــادی به صورت یک تیتر به دســـت می‌آید. تیتر یک آنتی‌بـــادی بعنوان کمترین رقتی از نمونه که فعالیت قابل شناســـایی را حفظ می‌کند تعریف می‌گردد.

آنتی‌بادی‌ها

آنتی‌بادی‌ها می‌توانند به عنوان ابزارهای اختصاصی و حساس برای ردیابی، شناسایی و تعیین مقدار آنتی‌ژن از یک ویـــروس، باکتری، قارچ و یا انگل بکار روند. آنتی‌بادی‌های اختصاصـــی ممکن اســـت از بیمـــاران دوره نقاهت (مثلا آنتی‌بادی‌های ضد ویروسی) بدســـت آیند و یا در حیوانات تهیه شـــوند. این آنتی‌بادی‌هـــا پلی کلونـــال (Polyclonal Antibodies) می‌باشند به این معنی که آن‌ها فرآورده‌های آنتی‌بادی هتروژنوس هســـتند که می‌توانند اپی توپ‌های بسیاری را روی یک آنتی‌ژن شناسایی کنند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونـــال (Monoclonal Antibodies) اپـــی توپ‌های منحصر بفـــرد را روی یک آنتی‌ژن شناســـایی می‌نمایند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال جهت برخی آنتی‌ژن‌ها مخصوصا برای پروتئین‌های سطح سلول لنفوسیت به صورت تجاری در دسترس هستند.

توســـعه تکنولـــوژی آنتی‌بـــادی مونوکلونـــال دانش ایمونولوژی را متحول کرد. برای مثال به علت اختصاصیت ایـــن آنتی‌بادی‌ها زیـــر مجموعه‌های لنفوســـیتی (مثلاً T ســـل‌های CD4 و CD8) و آنتی‌ژن‌های ســـطح ســـلول لنفوســـیت شناســـایی شـــدند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال محصولات سلول‌های هیبرید هستند که به وسیله ادغام و کلون کردن سلول طحال از یک موش ایمن شده و سلول میلوما که هیبریدومـــا (Hybridoma) ایجاد می‌کند، تولید می‌شـــوند. میلوما (Myeloma) نامیرایی را برای سلول‌های B تولیدکننـــده آنتی‌بادی طحال فراهـــم می‌کند. هرکلون هیبریدوما کارخانه‌ای برای تولید مولکول آنتی‌بادی است و آنتی‌بادی مونوکلونالی تولید می‌نماید که فقط یک اپی توپ (Epitope) را شناســـایی می‌کند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال همچنین می‌توانند از طریق مهندسی ژنتیک تهیه و دستکاری گردند و برای اســـتفاده درمانی در انسان تطبیق داده شوند.

از مزیت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (۱) اینکه اختصاصیت آن‌ها می‌تواند به یک اپی توپ منفرد روی یک آنتی‌ژن محدود شـــود و (۲) آن‌ها را می‌توان در مقیاس صنعتی فرآورده‌های کشت بافتی تهیه کرد. عیب بزرگ آنتی‌بادی‌های مونوکلونال این اســـت که آن‌ها اغلب خیلی اختصاصی هستند به طوری که یک آنتی‌بـــادی مونوکلونال اختصاصـــی برای یک اپی توپ روی یک آنتی‌ژن ویروســـی از یک سویه ممکن است نتواند سویه‌های مختلف از همان ویروس را شناسایی نماید.

روش‌های شناسایی

کمپلکس‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی می‌توانند مســـتقیماً بـــه وســـیله تکنیک‌های رســـوب دهـــی (Precipitation Techniques) یا به وسیله نشان‌دار کردن آنتی‌بادی با یک رادیواکتیو، فلوروســـنت یا پروب آنزیمی شناسایی شوند و یا

جدول ۱-۶. تکنیک‌های انتخاب شده ایمونولوژی

تکنیک	هدف	مثال‌های بالینی
ایمونودیفیوژن دوگانه اوشترلونی	شناسایی و مقایسه آنتی‌ژن و آنتی‌بادی	آنتی‌ژن و آنتی‌بادی قارچی
ایمونوفلورسانس	شناسایی و لوکالیزه شدن آنتی‌ژن	آنتی‌ژن ویروسی در بیوپسی (مانند هاری، ویروس هرپس سیمپلکس)
آنزیم ایمونواسی (Enzyme Immunoassay (EIA))	مشابه ایمونوفلورسانس	مشابه ایمونوفلورسانس
فلوسایتومتری ایمونوفلورسانس	آنالیز جمعیتی سلول‌های آنتی‌ژن مثبت	ایمونوفنوتایپینگ(Immunophenotyping)
ELISA	تعیین کمیت آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی	آنتی‌ژن ویروسی (روتاویروس)، آنتی‌بادی ضدویروسی (anti_HIV)
وسترن بلات (Western Blot)	شناسایی آنتی‌بادی اختصاصی آنتی‌ژن	اثبات مثبت بودن سرم از نظر آنتی HIV
رادیوایمونواسی Radioimmunoassay (RIA)	مشابه الایزا	مشابه با الایزا
تثبیت کمپلمان (CF)	تعیین مقدار تیترآنتی‌بادی اختصاصی	آنتی‌بادی ویروسی، قارچی
مهار هماگلوتیناسیون	تیتر آنتی‌بادی ضدویروسی، سروتایپ سویه ویروس	سروکانورجن سویه آنفلوآنزا موجود، شناسایی آنفلونزا
آگلوتیناسیون لاتکس	شناسایی و تعیین مقدار آنتی‌ژن و آنتی‌بادی	فاکتور روماتوئید، آنتی‌ژن‌های قارچی، آنتی‌ژن‌های استرپتوکوکی

HIV، ویروس نقص ایمنی انسان؛ Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA.

EIA، آنزیم ایمنواسی؛ RIA، رادیو ایمنواسی

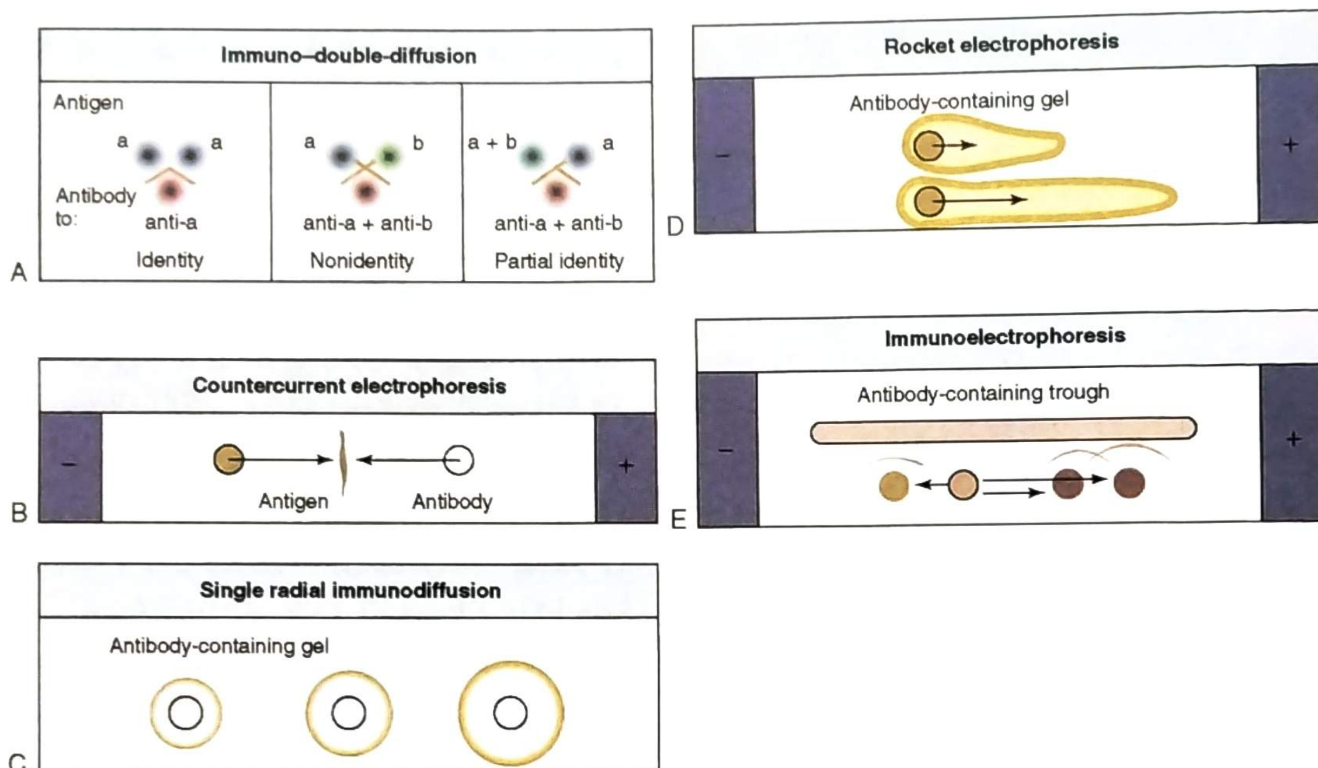
بصورت غیر مستقیم از طریق اندازه گیری واکنش، بر پایه آنتی‌بادی از قبیل تثبیت کمپلمان شناسایی گردند.

تکنیک‌های ایمونودیفیوژن و رسوب دهی

کمپلکس‌های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن و واکنش متقاطع اختصاصی می‌توانند به وسیله تکنیک‌های ایمونوپرسیپیتاسیون تشخیص داده شوند. در یک طیف غلظتی محدود برای هردو آنتی‌ژن و آنتی‌بادی که تحت عنوان منطقه تعادل (Equivalence Zone) نامیده می‌شود آنتی‌بادی با آنتی‌ژن واکنش متقاطع می‌دهد و کمپلکسی تشکیل می‌شود که برای باقی ماندن در فاز محلول خیلی بزرگ بوده و بنابراین رسوب می‌کند. این تکنیک براساس ماهیت چند ظرفیتی مولکول‌های آنتی‌بادی (مثلا ایمونوگلوبولین G[Ig] دارای دو ناحیه (Domain) اتصال به آنتی‌ژن دارد) می‌باشد. کمپلکس‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی در غلظتی که نسبت‌های آنتی‌ژن به آنتی‌بادی بالا یا پایین غلظت تعادل باشد محلول هستند.

تکنیک‌های ایمونودیفیوژن مختلفی با استفاده از مفهوم تعادل برای تعیین شناسایی یک آنتی‌ژن یا حضور آنتی‌بادی ساخته شده‌اند (شکل ۱-۶). ایمونودیفیوژن تک شعاعی (Single Radial Immunodiffusion) می‌تواند برای شناسایی و تعیین مقدار یک آنتی‌ژن بکار رود. در این تکنیک آنتی‌ژن در داخل چاهکی قرار می‌گیرد و اجازه داده می‌شود تا در آگار حاوی آنتی‌بادی (Antibody-containing Agar) منتشر شود. هرچه غلظت آنتی‌ژن بیشتر باشد به فاصله دورتری منتشر می‌شود و بعد از اینکه با آنتی‌بادی در آگار به تعادل رسید، به صورت حلقه‌ای اطراف چاهک رسوب می‌کند.

تکنیک ایمونودیفیوژن دوگانه اشترلونی (Ouchterlony Immuno-double-diffusion Technique) برای تعیین ارتباط آنتی‌ژن‌های مختلف همان طور که در شکل ۱-۶ نشان داده شده بکار می‌رود. در این تکنیک محلول‌های آنتی‌بادی و آنتی‌ژن در چاهک‌های جداگانه بریده شده در درون آگار قرار داده می‌شوند و به آنتی‌ژن و آنتی‌بادی اجازه داده می‌شود که به سوی هم انتشار یابند تا شیب غلظتی هر ماده ثابت شود. جایی که غلظت‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به تعادل می‌رسند یک خط رسوبی قابل مشاهده، ایجاد می‌شود. براساس الگوی خطوط رسوبی این تکنیک همچنین می‌تواند برای تعیین اینکه آیا



شکل ۱-۶. آنالیز آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها به وسیله ایمونوپرسیپیتاسیون. پرسیپیتاسیون پروتئین در نقطه تعال رخ می‌دهد در مکانی که آنتی‌بادی چند ظرفیتی کمپلکس‌های بزرگی را با آنتی‌ژن تشکیل می‌دهند. A، ایمونودیفیوژن دوگانه اوشترلونی. آنتی‌ژن و آنتی‌بادی از چاهک‌ها منتشر می‌شوند، با یکدیگر برخورد می‌کنند و یک خط رسوبی تشکیل می‌شود. اگر آنتی‌ژن‌های مشابهی در مجاور چاهک‌ها قرار داده شـوند غلظت آنتی‌ژن بین آن‌ها دو برابر می‌شود و رسوب در این ناحیه رخ نمی‌دهد. اگر آنتی‌ژن‌های متفاوتی استفاده شود دو خط رسوبی متفاوت تولید می‌گردد. چنانکه در نمونه دو آنتی‌ژن وجود داشته باشد که شبیه نباشند، خط رسوبی فقط برای آنتی‌ژن کامل تشـکیل می‌شود. B، الکتروفورز کانترکارنت (Countercurrent). این روش شـبیه روش اوشترلونی است اما حرکت آنتی‌ژن به وسیله الکتروفورز آسـان می‌گردد. C، ایمونودیفیوژن تک شعاعی. این تکنیک با انتشار آنتی‌ژن به داخل ژل حاوی آنتی‌بادی صورت می‌گیرد. حلقه‌های رسـوبی دلالت به یک واکنش ایمنی دارد و ناحیه حلقه نشـان دهنده نسـبتی از غلظت آنتی‌ژن است. D، راکت الکتروفورز. آنتی‌ژن‌هـا از طریـق الکتروفورز در داخـل ژل آگاردار حاوی آنتی‌بادی پخش می‌شـوند. طول راکت دلالت بـر غلظت آنتی‌ژن دارد. E، ایمونوالکتروفورز. آنتی‌ژن را درون چاهکی قرار داده و توسـط الکتروفورز پخش می‌کنند. آنتی‌بادی در سراسر ژل قرار داده می‌شود و در صورت انتشار آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به طرف یکدیگر خطوط رسوبی تشکیل می‌شود.

نمونه‌ها شبیه، البته در برخی اپی توپ‌ها اما نه در همه آن‌ها مشترک‌اند (شناسـایی نسبی) یا متفاوت، بکار می‌رود. این تکنیک برای تشخیص آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های قارچی (مانند گونه‌های هیستوپلاسما، گونه‌های بلاستومایسس و کوکسیدیومایکوزیس) بکار می‌رود.

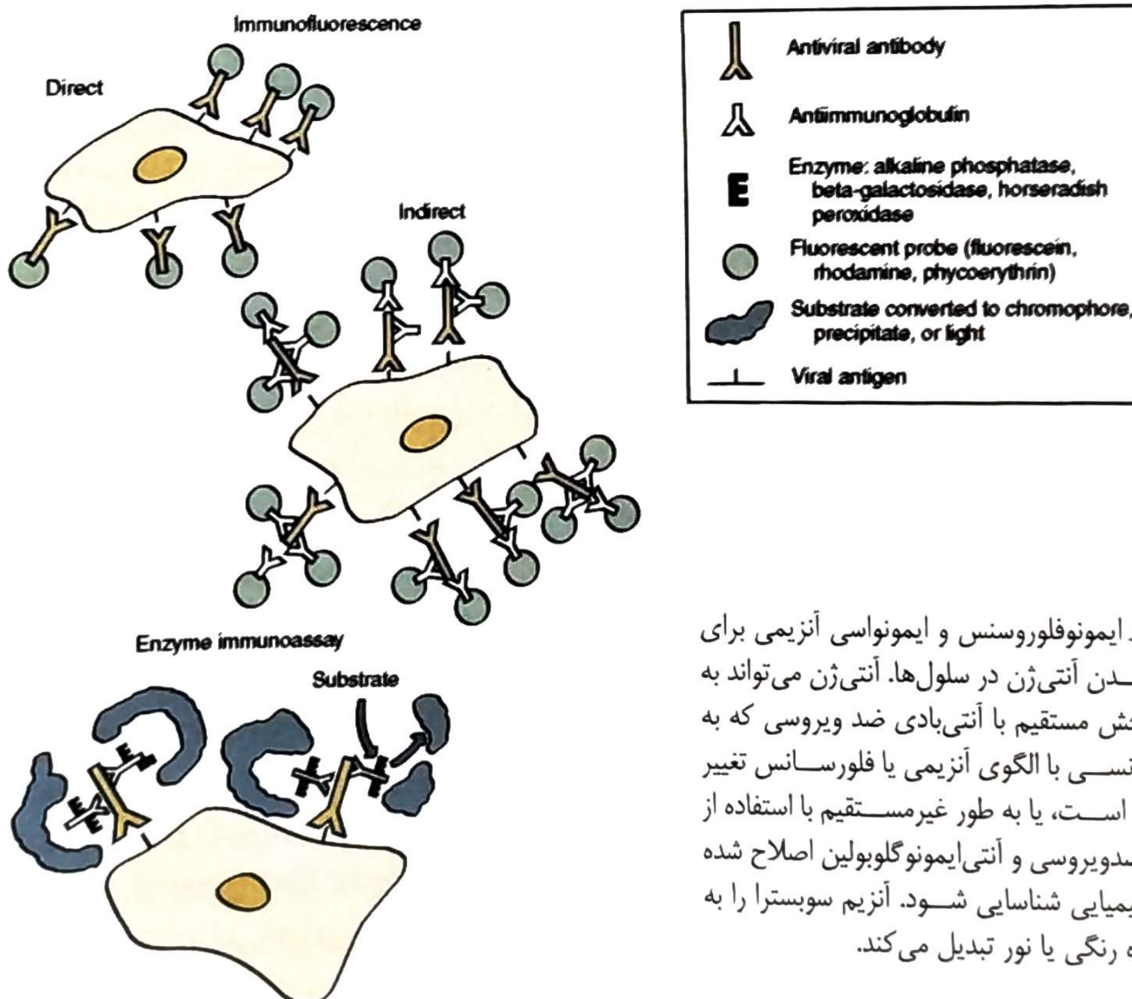
در سـایر تکنیک‌های ایمونودیفیـوژن آنتی‌ژن ممکن است به وسیله الکتروفورز در داخل آگار جدا شود و سپس با آنتی‌بادی (ایمونوالکتروفورز [Immunoelectrophoresis]) واکنش دهد، ممکن اسـت به وسیله روش‌های الکتروفورز آنتـی‌ژن را درون آگاری کـه حـاوی آنتی‌بـادی اسـت (راکت الکتروفورز [Rocket Electrophoreis]) وارد کنند و یا ممکن است آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در چاهک‌های جداگانه قرار داده شوند و اجازه داده شود که به صورت الکتروفورتیک به سمت یکدیگر حرکت کنند (کانترکارنت ایمونوالکتروفورز [Countercurrent Immunoelectrophoresis]).

ایمونواسـی برای آنتی‌ژن مرتبط با سـلول (ایمونوهیستولوژی [Immunohistology])

آنتی‌ژن‌های سطح سـلول یا داخل سلول می‌توانند به وسـیله ایمونوفلورسـانس و آنزیم ایمونواسی (Enzyme Immunassay (EIA)) شناسایی شوند. در ایمونوفلورسانس مسـتقیم (Direct Immunofluorescence)، ملکـول فلورسـانس به صورت کـووالان به آنتی‌بادی می‌چسـبد (مثلاً آنتی‌بادی ضد ویروسـی خرگوش، نشـان دارشده با فلورسئین- ایزوتیوسیانات (Fluorescein-isothiocyanate

[FITC]). در ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (Immunofluorescence Indirect)، یک آنتی‌بادی فلورسانس ثانویه اختصاصی برای آنتی‌بادی اولیه (مثلاً آنتی‌بادی ضد خرگوشی بز نشان دار شده با فلورسئین-ایزوتیوسیانات) برای شناسایی آنتی‌بادی ضد ویروسی اولیه و محل آنتی‌ژن بکار می‌رود (شکل‌های ۲-۶ و ۳-۶). در EIA، آنزیمی مانند پراکسیداز ترب کوهی (Horseradish Peroxidase) یا آلکالین فسفاتاز (Alkaline Phosphatase) به آنتی‌بادی، کونژوگه می‌شود و برای شناسایی آنتی‌ژن، سوبسترا را به یک کروموفور تبدیل می‌کند. در روشی دیگر آنتی‌بادی تغییر یافته به وسیله اتصال ملکول بیوتین (Bioton) (نوعی ویتامین است) می‌تواند توسط میل اتصالی بالای ملکول‌های آویدین (Avidin) یا استرپتاویدین (Streptavidin) در یک نقطه قرار گیرد. مولکول فلوروسنت یا آنزیم به آویدین یا استرپتاویدین متصل می‌شود و اجازه شناسایی را می‌دهد. این تکنیک‌ها برای آنالیز نمونه‌های بیوپسی بافت سلول‌های خون و سلول‌های کشت بافت سودمند باشند.

فلوسایتومتر (Flow Cytometer) می‌تواند برای آنالیز ایمونوفلورسانس سلول‌ها در سوسپانسیون بکار رود و مخصوصاً برای شناسایی و کمیت سنجی لنفوسیت‌ها (ایمونوفنوتایپینگ (Immunophenotyping)) مفید است (شکل ۴-۶). لیزری که در فلوسایتومتر بکار می‌رود برای برانگیختن آنتی‌بادی فلورسانس چسبیده به سلول و آشکارسازی اندازه سلول به وسیله روش‌های اندازه‌گیری تفرق نور (light-scattering) می‌باشد. استفاده از آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با رنگ‌های فلوروسنت مختلف امکان آنالیز همزمان چندین ملکول با دستگاههایی که می‌توانند تا ۱۲ رنگ فلوروسنت مختلف و پارامترها را آنالیز نمایند فراهم می‌سازند. جریان سلول‌ها از میان لیزر به میزان بیشتر از ۵۰۰۰ سلول در ثانیه جاری می‌شوند و آنالیز به صورت الکترونیکی انجام می‌شود. تفکیک سلول فعال شده با فلورسانس (-Fluorescence (activated Cell Sorter (FACS) تحت عنوان فلوسایتومتر نامیده می‌شود که می‌تواند زیر جمعیت



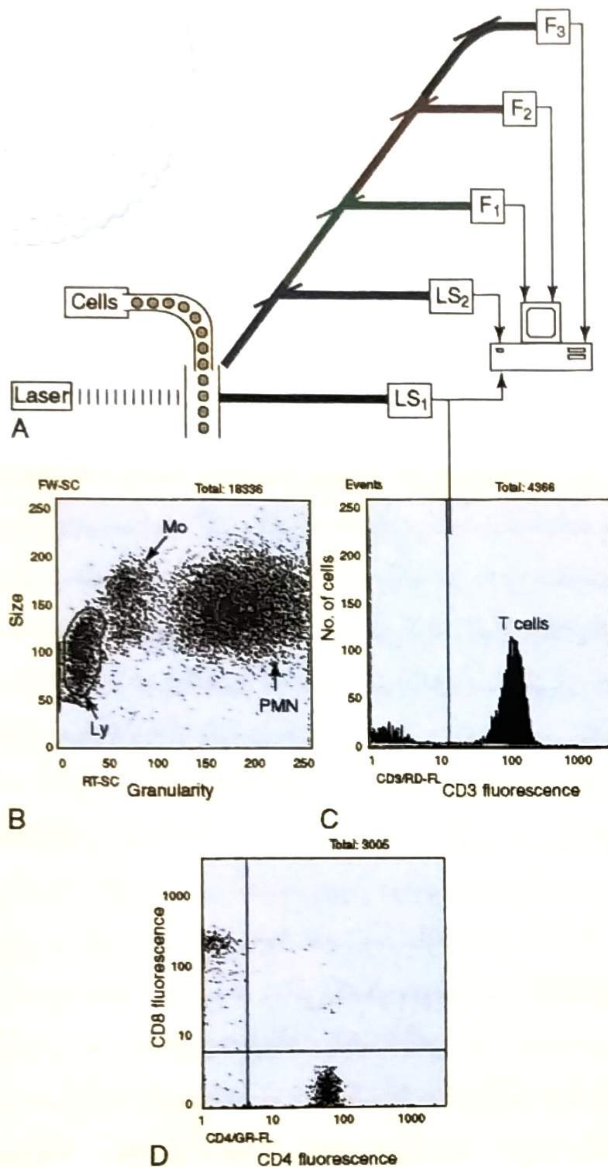
شکل ۲-۶. ایمونوفلوروسنس و ایمونواسی آنزیمی برای لوکالیزه شدن آنتی‌ژن در سلول‌ها. آنتی‌ژن می‌تواند به وسیله سنجش مستقیم با آنتی‌بادی ضد ویروسی که به طور کووالانسی با الگوی آنزیمی یا فلورسانس تغییر داده شده است، یا به طور غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌بادی ضدویروسی و آنتی‌ایمونوگلوبولین اصلاح شده به روش شیمیایی شناسایی شود. آنزیم سوبسترا را به رسوب، ماده رنگی یا نور تبدیل می‌کند.



شکل ۳-۶. لوکالیزه شدن ایمونوفلورسانس سلول‌های عصبی آلوده به ویروس هرپس سیمپلکس در یک برش مغزی از بیمار مبتلا به آنسفالیت هرپس.

خاصی از سلول‌ها را برای رشد کشت بافت براساس اندازه و ایمونوفلورسانس آن‌ها جدا کند. در تغییرات بر روی این دستاورد از ابزارهایی استفاده می‌شود که هر سلول را در گردش و یا روی اسلاید تصویربرداری و آنالیز نماید.

اطلاعات بدست آمده از فلوسایتومتر معمولاً به شکل هیستوگرام ارائه می‌گردد بطوری که شدت فلورسانس روی محور x و تعداد سلول‌ها روی محور y و یا به صورت طرح نقطه‌ای که در آن بیش از یک پارامتر برای هر سلول مقایسه می‌شود، ارائه می‌گردد. فلوسایتومتر می‌تواند یک آنالیز افتراقی از سلول‌های سفید خون انجام دهد. همانطور که در شکل ۴-۶ نشان داده شده است تمام سلول‌هایی که پارامتر خاصی بیان می‌کنند (مثلاً اندازه، گرانولاریتی و مارکر CD3 سلول T) را می‌توان به صورت الکترونیکی به وسیله نشاندار کردن ناحیه گرافیکی آن و سپس انتخاب (gated) برای آنالیز بیشتر (مثلاً بیان CD4 و CD8) در گراف‌های حاصله شناسایی نمود. فلوسایتومتری همچنین برای آنالیز رشد سلولی بعد از نشان‌دار کردن داکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) با فلوروسنت و سایر ابزارهای فلوروسنت مفید است.



شکل ۴-۶. فلوسایتومتری. **A**، فلوسایتومتر در واقع ارزیابی پارامترهای سلولی منحصربفرد که در آن جریان سلول‌ها از یک بیم لیزری به میزان ۵۰۰۰ در ثانیه می‌گذرد. اندازه سلولی و دانه‌دار بودن آن از طریق پراکنده‌های نوری (LS) سنجیده می‌شود و بیان آنتی‌ژن از طریق ایمونوفلورسانس (F) و با کمک آنتی‌بادی نشان‌دارشده با پروب‌های فلورسانس مختلف تعیین می‌گردد. قسمت‌های **B تا D** آنالیز سلول T در فرد سالم را نمایش می‌دهد. **B**، آنالیز پراکندگی نور برای شناسایی لنفوسیت (Ly)، مونوسیت (Mo) و لوکوسیت‌های پلی مورفونوکلئر (نوتروفیل) استفاده می‌شود. **C**، لنفوسیت‌ها برای بیان CD3 جهت شناسایی سلول‌های T (ارائه‌شده در هیستوگرام) آنالیز شدند. **D**، T سل‌های CD4 و CD8 شناسایی شده‌اند. هر نقطه نشان دهنده یک یا چندین سلول است.

ایمونواسی برای آنتی‌بادی و آنتی‌ژن محلول

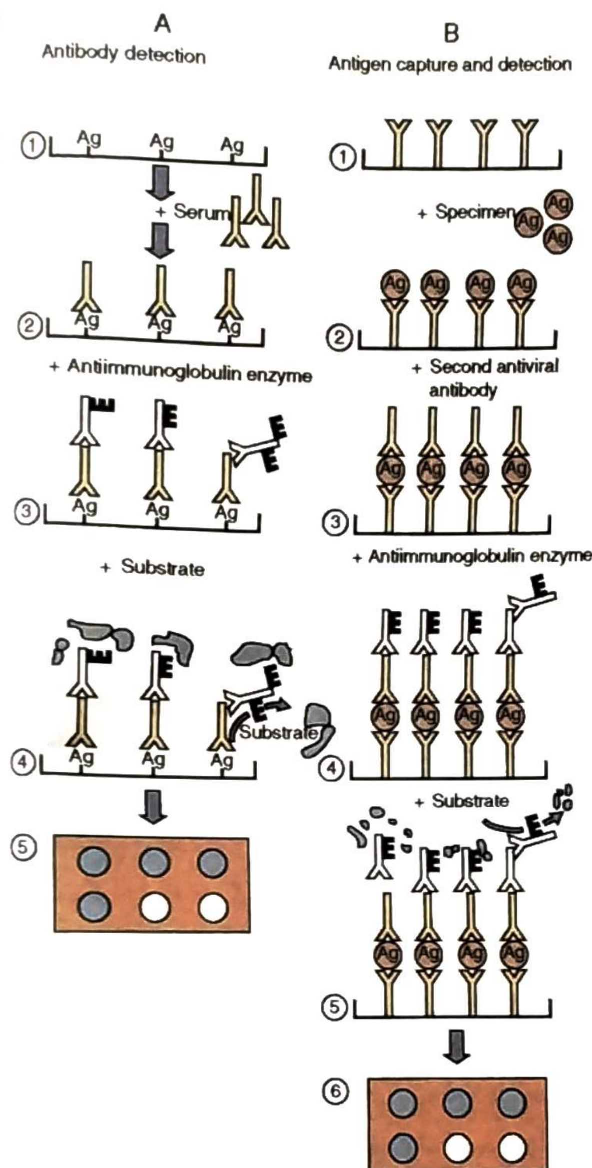
الایزا (Enzyme-linked Immunosorbent Assay [ELISA]) روشی است که در آن از آنتی‌ژن فیکس شده روی سطح پلاستیک، ذرات ریز و یا فیلتر برای به دام انداختن و جدا کردن آنتی‌بادی خاص از سایر آنتی‌بادی‌ها

در سرم فرد بیمار استفاده می‌شود (شکل ۵-۶). یک آنتی‌بادی ضد انسانی با یک آنزیم متصل شده بصورت کووالانی (مثلا پراکسیداز ترب کوهی، آلکالین فسفاتاز و β-گالاکتوزیداز) آنتی‌بادی آزاد بیمار را شناسایی می‌نماید. این پدیده بصورت اسپکتروفتومتری بر اساس شدت رنگی که در پاسخ به تبدیل آنزیمی به یک سوبسترای مناسب ایجاد شده، ارزیابی می‌شود. غلظت واقعی آنتی‌بادی خاص می‌تواند توسط مقایسه با فعالیت محلول‌های استاندارد آنتی‌بادی انسان تعیین گردد.

همچنین ELISAها می‌توانند برای تعیین مقدار آنتی‌ژن محلول در نمونه بیمار بکار روند. در این آزمون‌ها آنتی‌ژن محلول به وسیله آنتی‌بادی غیر متحرک به دام افتاده و متمرکز می‌شود و سپس به وسیله یک آنتی‌بادی متفاوت نشان‌دار شده با آنزیم شناسایی می‌گردد. انواع زیادی از ELISAها در روشی که در آن آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن را به دام می‌اندازند یا شناسایی می‌کنند، متفاوت هستند.

آنالیز وسترن بلات (Western Blot Analysis) نوعی ELISA است. در این تکنیک پروتئین‌های ویروسی به وسیله الکتروفورز بر اساس وزن مولکولی یا بار آن‌ها به روی یک کاغذ صافی (مانند نیتروسلولز، نایلون) انتقال (لکه‌ای) داده می‌شوند. زمانی که در معرض سرم انسان قرار می‌گیرد پروتئین‌های ثابت شده آنتی‌بادی اختصاصی ویروس را به دام می‌اندازند و با یک آنتی‌بادی آنتی هیومن کونژوگه شده با آنزیم مشاهده می‌شوند. این تکنیک پروتئین‌هایی که بوسیله سرم بیمار شناخته شده‌اند را نشان می‌دهد. آنالیز وسترن بلات برای تأیید نتایج ELISA در بیماران مشکوک به آلودگی با ویروس نقص سیستم ایمنی (HIV) بکار می‌رود (شکل ۶-۶، شکل ۷-۳۹ را نیز ببینید).

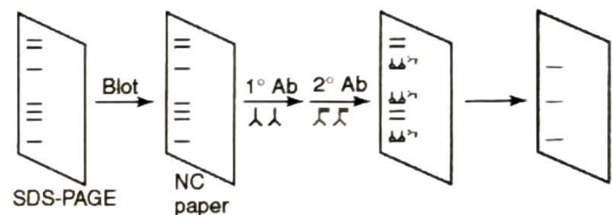
تست‌های سریع برای استفاده در خانه از قبیل تست بررسی بارداری در خانه برای هورمون گنادوتروپین جفت انسان با استفاده از روش Lateral Flow Visual Assay انجام می‌شوند. نوار تست در داخل نمونه ادرار یا سایر مایعات قرار داده می‌شود و مایع حاوی آنتی‌ژن از بخش حاوی آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با آنزیم می‌گذرد و سپس به بخش دیگری ادامه پیدا می‌کند که در آنجا کمپلکس را به دام انداخته و تغلیظ می‌کند و دارای سوبسترایی برای آنزیم است تا نتیجه نمایش داده شود.



شکل ۵-۶. آنزیم ایمونواسی‌ها برای تعیین مقدار آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن. **A**، شناسایی آنتی‌بادی: (۱) آنتی‌ژن (Ag) ویروسی حاصل از سلول‌های آلوده (ویریون) یا آنتی‌ژن دستکاری شده با روش‌های مهندسی بر روی یک سطح اضافه می‌شوند. (۲) سرم بیمار اضافه شده و بعد از مدتی آنتی‌بادی موجود در سرم به آنتی‌ژن وصل می‌شود، آنتی‌بادی متصل نشده در اثر شستشو حذف می‌گردد. (۳) آنتی‌بادی (E) ضد انسانی کونژوگه به آنزیم اضافه می‌شود و آنتی‌بادی متصل نشده دوباره در اثر شست و شو حذف می‌شود. (۴) سوبسترا اضافه می‌شود و (۵) به ماده رنگی، پرسیپیته یا نور تبدیل می‌شود. **B**، تسخیر آنتی‌ژن و شناسایی: (۱) آنتی‌بادی ضد ویروسی بر روی سطح اضافه می‌شود. (۲) آنتی‌ژن به آن اضافه می‌گردد. (۳) آنتی‌بادی ضد ویروسی ثانویه برای آشکارسازی آنتی‌ژن تسخیر شده به آن اضافه می‌شود. (۴) آنتی‌بادی ضد انسانی کونژوگه به آنزیم اضافه شده و شست شو انجام می‌شود. (۵) سوبسترا اضافه می‌گردد. (۶) سوبسترا به کروموفور (ماده رنگی) پرسیپیته یا نور تبدیل می‌شود.

در **رادیوایمونواسی ([RIA]) Radioimmunoassay** از آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن نشان دار شده با رادیواکتیو (مثلا با ید-۱۲۵) برای اندازه‌گیری کمپلکس آنتی‌ژن- آنتی‌بادی استفاده می‌شود. RIA همان طور که قبلاً برای ELISA شرح داده شد می‌تواند بعنوان آزمون جذبی و یا بعنوان سنجش رقابتی انجام شود. در سنجش رقابتی، آنتی‌بادی در سرم بیمار بر طبق توانایی آن برای رقابت و جایگزینی با آنتی‌بادی نشان‌دار شده با رادیواکتیو تهیه شده در آزمایشگاه از کمپلکس‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی مقدارسنجی می‌شود. آزمون رادیوآلرژوسوربنت (Radioallergosorbent Assay) نوعی آزمایش RIA جذبی است که در آن آنتی‌بادی بیمار با آنتی IgE متصل به آلرژن تثبیت شده رقابت می‌کند، امّا این آزمایش با تست‌های الایزا جایگزین شده است.

تثبیت کمپلمان (Complement Fixation) یک تست سرولوژیکی استاندارد اما از نظر تکنیکی دشوار می‌باشد (کادر ۱-۶). در این تست نمونه سرم بیمار با آنتی‌ژن بدست آمده از آزمایشگاه و کمپلمان اضافی واکنش می‌دهد. اتصال کمپلکس‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی سبب فعال شدن و تثبیت شدن (مصرف شدن) کمپلمان می‌شوند. سپس کمپلمان باقی مانده از طریق لیز سلول‌های قرمز خون پوشیده شده با آنتی‌بادی اندازه گیری می‌شود. آنتی‌بادی‌های اندازه‌گیری‌شده به وسیله این سیستم معمولا به آرامی در طی بیماری افزایش می‌یابند و توسط دیگر تکنیک‌ها اندازه گیری می‌شوند. یک نوع از این تست همچنین می‌تواند برای شناسایی نقص‌های ژنتیکی در اجزاء کمپلمان استفاده شود.



شکل ۶-۶. آنالیز وسترن بلات. پروتئین‌ها به وسیله الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید دودسیل سولفات سدیم (SDS-PAGE) جدا می‌شوند و بر روی یک کاغذ نیتروسلولزی (NC) لکه گذاری می‌گردند و با آنتی سرم اختصاصی ژن یا سرم بیمار (1°Ab) انکوبه می‌شوند و سپس سرم کونژوگه با آنزیم (2°Ab) اضافه می‌شود. تغییر آنزیمی سوبسترا موجب شناسایی آنتی‌ژن می‌گردد.

کادر ۱-۶. آزمون‌های سرولوژی

تثبیت کمپلمان
* ممانعت از هماگلوتیناسیون
نوترالیزاسیون (خنثی سازی)
ایمونوفلورسانس (مستقیم و غیر مستقیم)
آگلوتیناسیون لاتکس
ایمونواسی آنزیمی در جا (EIA)
Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
رادیوایمونواسی (RIA)

* برای شناسایی آنتی بادی یا سروتایپینگ ویروس

آزمون‌های مهار آنتی‌بادی استفاده از اختصاصیت یک آنتی‌بادی برای ممانعت از عفونت (خنثی سازی (Neutralization)) یا دیگر فعالیت‌ها (ممانعت از هماگلوتینین (Hemagglutinnation Inhibition) برای شناسایی گونه عامل عفونت، معمولا یک ویروس، یا برای اندازه‌گیری مقدار پاسخ‌های آنتی‌بادی علیه سویه خاص ویروس را ممکن می‌سازد. برای مثال ممانعت از هماگلوتینین برای تعیین سویه‌های مختلف آنفولانزا A و قدرت آنتی بادی تولیدشده توسط واکسن‌های جدید برای آنفلوآنزا استفاده شده است. در فصل ۴۹ بیشتر راجع به این تست‌ها بحث شده است.

آگلوتیناسیون لاتکس (Latex Agglutination) یک آزمون سریع و از نظر تکنیکی ساده برای نشان دادن آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن محلول می‌باشد. آنتی‌بادی اختصاصی ویروس سبب می‌شود که ذرات لاتکس با آنتی‌ژن‌های ویروسی پوشیده شوند و ایجاد توده کنند. بر عکس، ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی‌بادی برای تشخیص آنتی‌ژن ویروسی محلول بکار می‌روند. **در هماگلوتیناسیون غیر فعال** از اریتروسیت‌های تغییر آنتی‌ژنی داده شده بعنوان شاخص‌هایی به جای ذرات لاتکس استفاده می‌شوند.

سرولوژی

پاسخ ایمنی هومورال سابقه‌ای از عفونت‌های بیمار را نشان می‌دهد. سرولوژی می‌تواند برای شناسایی عامل ایجادکننده عفونت، ارزیابی دوره عفونت یا تعیین ماهیت عفونت که آیا یک عفونت اولیه است یا عفونت عود شونده

کادر ۲-۶. شناسایی ویروس‌ها توسط سرولوژی*

ویروس اپشتین‌بار
ویروس سرخجه
ویروس‌های هپاتیت A، B، C، D و E
ویروس‌های نقص سیستم ایمنی انسان
ویروس لوسمی سلول T انسان
آربو ویروس‌ها (ویروس‌های آنسفالیت)

*تست‌های سرولوژی برای تشخیص وضعیت ایمنی فرد با توجه به سایر ویروس‌ها بکار می‌روند.

و آیا مزمن است یا حاد، بکار رود. نوع آنتی‌بادی و تیتر آن و شناسایی اهداف آنتی‌ژنی اطلاعات سرولوژی را درباره یک عفونت فراهم می‌کند. تست سرولوژی برای تشخیص ویروس‌ها و سایر عواملی که جداسازی و رشد آن‌ها در آزمایشگاه مشکل می‌باشند و یا سبب بیماری‌هایی می‌شوند که به آهستگی پیشرفت می‌کنند، بکار می‌روند (کادر ۲-۶).

غلظت نسبی آنتی‌بادی بعنوان تیتر گزارش می‌شود. تیتر در واقع عکس بالاترین رقت یا پایین‌ترین غلظت (مثلاً رقت ۱:۶۴ = تیتر ۶۴) سرم بیمار که فعالیتش را در یکی از ایمونواسی‌های شرح داده شد حفظ می‌کند، می‌باشد. مقدار IgM، IgG، IgA یا IgE که با آنتی‌ژن واکنش می‌دهند می‌توانند از طریق بکار بردن آنتی‌بادی نشان‌دار ضد انسانی مخصوص ایزوتیپ آنتی‌بادی نیز ارزیابی شوند.

سرولوژی برای تعیین دوره یک عفونت استفاده می‌شود. **سروکانورژن (Seroconversion)** زمانی که آنتی‌بادی در پاسخ به عفونت اولیه تولید شده است، رخ می‌دهد. آنتی‌بادی IgM اختصاصی در طی ۲ تا ۳ هفته اول عفونت اولیه یافت می‌شود که شاخص خوبی از عفونت اولیه اخیر می‌باشد. در طی عفونت مجدد یا بازگشت بعدی عفونت در روند زندگی **پاسخ مجدد (Anamnestic)** (پاسخ ثانویه یا یادآور) ایجاد می‌کند. تیترهای آنتی‌بادی در بیمارانی که بیماری آن‌ها مکرراً عود می‌نماید (مثلا هرپس ویروس‌ها) ممکن است بالا باقی بماند. سروکانورژن یا عفونت مجدد به وسیله یک افزایش حداقل ۴ برابر در تیتر آنتی‌بادی بین سرم فاز حاد و نقاهت تشخیص داده می‌شود که این حداقل ۲ تا ۳ هفته بعد در طی فاز نقاهت بدست می‌آید. رقت سریالی دو برابر بین نمونه‌هایی با ۵۱۲ و ۱۰۲۳ واحد آنتی‌بادی مشخص نخواهد شد هر دو آن‌ها در رقت ۵۱۲ واکنش می‌دهند اما با رقت ۱۰۲۴ واکنش نمی‌دهد و هر دو نتیجه می‌توانند بعنوان تیترهای ۵۱۲ گزارش شوند. از طرف دیگر نمونه‌هایی با ۱۰۲۰ و ۱۰۳۰ واحد به طور معنی داری با هم تفاوت ندارد اما می‌توانند به ترتیب بصورت تیترهای ۵۱۲ و ۱۰۲۴ گزارش شوند.

سرولوژی همچنین می‌تواند برای تشخیص مرحله عفونت آهسته‌تر یا مزمن (مثلا هپاتیت B یا مونونوکلئوز عفونی ایجاد شونده به وسیله ویروس اپشتین بار) بر اساس حضور آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های میکروبی اختصاصی بکار رود. آنتی‌بادی‌هایی که در ابتدا تشخیص داده می‌شوند همان‌هایی‌اند که مستقیماً ضد آنتی‌ژنی‌هایی که بیشتر در دسترس سیستم ایمنی هستند (مثلا روی ویروس، روی سطوح سلول‌های عفونی و ترشح شده) می‌باشند. در مراحل بعدی عفونت، زمانی که سلول‌ها به وسیله ویروس‌های عفونی یا پاسخ‌های ایمنی سلولی لیز می‌شوند آنتی‌بادی‌های ایجاد شده علیه پروتئین‌های داخل سلولی و آنزیم‌ها شناسایی می‌شوند.

سؤال‌ها

روش یا روش‌های تشخیصی مناسب (مولکولی یا ایمونولوژی) برای هر یک از موارد زیر را نام ببرید.:

۱. تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های HIV.
۲. شناسایی پاپیلوما ویروس ۱۶ (یک ویروس غیر تکثیر شونده) در پاپانیکولا اسمیر (pap).
۳. شناسایی هرپس سیمپلکس ویروس (HSV) (یک ویروس تکثیر شونده) در یک پاپ اسمیر.
۴. حضور آنتی‌ژن‌های قارچی هیستوپلاسما در سرم بیمار.
۵. غلظت‌های T سل‌های CD8 و CD4 در خون بیمار عفونی شده HIV.
۶. وجود آنتی‌بادی و آنتی‌بادی ضد HIV
۷. تفاوت‌های ژنتیکی بین دو HSV (DNA ویروس).
۸. تفاوت ژنتیکی بین ویروس‌های پاراآنفلوآنزا (ویروس ریبونوکلئیک اسید (RNA)).
۹. تعیین میزان آنتی‌ژن روتاویروس در مدفوع.
۱۰. تعیین استرپتوکوکوس‌های گروه A و افتراق آن از سایر استرپتوکوکوس‌ها.

پاسخ‌ها

۱. SDS-PAGE برای جداسازی پروتئین‌ها و وسترن‌بلات برای شناسایی پروتئین‌های HIV مناسب است.
۲. روش‌هـــای ردیابی ژنوم مانند هیبریدیزاســـیون درجا بـــر روی پاپ اســـمیر یا یک PCR از ســـلول‌های به دســـت‌آمده در طی عمل می‌توانند استفاده شوند زیرا پروتئین‌های ویروس غیرقابل تشخیص هستند.
۳. اثرات سایتوپاتولوژیک مانند سن سی شیا و انکلوزیون cowdry type A می‌توانند در پاپ اســـمیر دیده شوند. روش‌های ردیابی ژنوم مانند هیبریدیزاسیون درجا روی پاپ اسمیر، PCR از DNA به دست‌آمده از سلول‌ها یا روش‌های ایمونولوژیک برای ردیابی آنتی‌ژن ویروسی، می‌توانند برای اثبات وجود ویروس استفاده شوند.
۴. آنتی بادی دیفیوژن اشـــترلونی یا روش الایزا می‌تواند برای ردیابی قارچ‌ها استفاده شوند.
۵. فلوسایتومتری با اســـتفاده از ایمونوفلورسنس احتمالاً بهترین روش شناســـایی و تعیین کمیت ســـلول‌های CD4 و CD8 می‌باشد.
۶. الایزا برای تعیین حضور و تیتر آنتی‌بادی ضد HIV به منظور غربالگری خون به کار می‌رود؛ از وسترن بلات جهت تأیید نتیجه الایزا استفاده می‌شود.
۷. از PCR یا RFLP می‌توان برای ردیابی تفاوت ژنتیکی بین انواع سویه‌های HSV استفاده نمود.
۸. از Reverse transcriptase PCR می‌تـــوان بـــرای تشخیص دو ویروس پاراآنفلوآنزا استفاده کرد.
۹. تعیین میزان روتاویروس در مدفوع را می‌توان از طریق الایـــزا انجام داد. میکروســـکوپ الکترونی یک روش کیفی است.
۱۰. اســـترپتوکوکوس گروه A را می‌توان توســـط روش الایزا شناسایی کرد که شامل روش سریع (مانند over-the-counter pregnancy) برای ردیابی استرپتولیزین S و F می‌باشـــد. از روش‌هایی ماننـــد پالس فیلد ژل الکتروفورز (PFGE) و PCR می‌توان برای شناســـایی سویه‌های مختلف اســـتفاده کرد. همچنین می‌توان از توالی‌یابی قطعه‌ای از ژنوم اســـترین‌های مختلف برای مقایسه استفاده کرد.

بخش ۳

مفاهیم اصلی در پاسخ ایمنی

فصل

۷

پاسخ‌های ایمنی در برابر عوامل عفونی

فصل‌های قبل موجود در این بخش عوامل ایمونولوژیک مختلف و خصوصیات آن‌ها را ارائه نمودند. این فصل نقش‌های مختلفی که آن‌ها در حفاظت میزبان در برابر عفونت بازی می‌کنند، تقابل آن‌ها و پیامدهای ایمونوپاتوژنیکی که در نتیجه پاسخ بوجود می‌آید را شرح می‌دهد (کادر ۱-۷).

اغلب عفونت‌ها قبل از اینکه ایمنی اکتسابی شروع به فعالیت کند، توسط ایمنی ذاتی کنترل می‌شوند امّا پاسخ‌های ایمنی اکتسابی برای برطرف کردن بسیاری از دردسرهای عفونت‌ها لازم هستند. اهمیت هر کدام از ترکیبات سیستم دفاعی میزبان برای عوامل عفونی مختلف، متفاوت است (جدول ۱-۷) و اهمیت هر کدام از این ترکیبات زمانی آشکار می‌شود که به طور ارثی کاهش یابند یا در اثر شیمی درمانی، بیماری یا عفونت (مثلاً سندرم نقص ایمنی اکتسابی [AIDS]) مهار شوند.

انسان‌ها چهار راه اصلی برای حفاظت در برابر عفونت میکروبی نامناسب بکار می‌گیرند:

(۱) **سدهای طبیعی** از قبیل پوست، موکوس، اپیتلیوم مژک دار، اسید معده و صفرا ورود عامل را محدود می‌کنند.

(۲) **رقابت با فلور نرمال.**

(۳) **دفاع‌های ایمنی ذاتی غیر اختصاصی علیه آنتی‌ژن** از قبیل تب، پپتیدهای ضدمیکروبی، اینترفرون، کمپلمان، نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک (DNs) و سلول‌های کشنده طبیعی (NK)، سلول‌های لنفوئید ذاتی (شامل سلول‌های کشنده طبیعی [NK]، و سلول‌های T ذاتی (سلول T مرتبط با مخاط [MALT])، سلول NKT [NKT])، سلول‌های λδT و سلول‌های B-1B که پاسخ پیوسته و سریعی را در محل عفونت ایجاد می‌کنند تا رشد و گسترش عامل بیماریزا را محدود نمایند.

(۴) **پاسخ‌های ایمنی آداپتیو اختصاصی آنتی‌ژن** از قبیل آنتی‌بادی و سلول‌های T که پاسخ‌های ایمنی ذاتی را تقویت می‌نماید و به طور اختصاصی هدف‌گیری می‌کنند، حمله می‌کنند و عامل مهاجم را که در عبور از دو مانع اول موفق بوده حذف می‌کنند.

علائم و بیماری وقتی اتفاق می‌افتند که عملکردهای سد و پاسخ‌های ذاتی جهت نگهداری فلور نرمال در داخل

جدول ۱-۷. اهمیت دفاع‌های ضد میکروبی برای عوامل عفونی

دفاع میزبان	باکتری‌ها	باکتری‌های درون سلولی	ویروس‌ها	قارچ‌ها	انگل‌ها
کمپلمان	+++	-	-	-	+
اینترفرون آلفا / بتا	-	+	++++	-	-
نوتروفیل‌ها	++++	-	+	+++	++
ماکروفاژها	+++	+++*	++	++	+
سلول‌های NK (سلول کشنده طبیعی)	-	-	+++	-	-
CD4TH1	+	++	+++	++	+
CD4TH17	++	++	++	++++	+
لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک CD8	-	++	++++	-	-
آنتی‌بادی	+++	+	++	++	++(IgE)[t]

* به وسیله فعال‌سازی ماکروفاژهای M1.

t ایمونو گلوبولین E و سلول‌های T برای عفونت‌های ایجاد شده توسط کرم‌ها مهم می‌باشند.

کادر ۱-۷. خلاصه پاسخ ایمنی

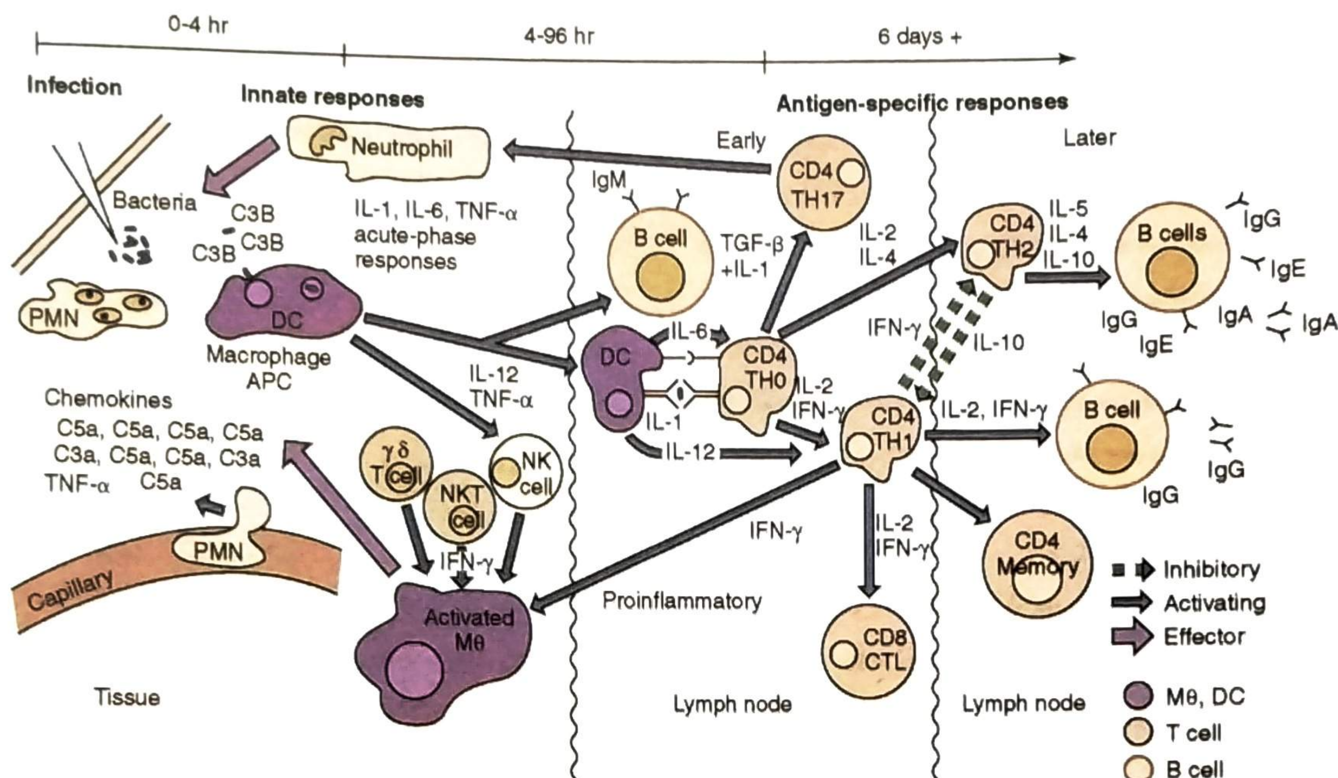
ظهور پاسخ ایمنی میزبان به عفونت، بعد از حمله عامل عفونی با توجه به نوع میکروب به صورت‌های مختلفی رخ می‌دهد. سلول‌های دخیل در این روند عبارتند از، سلول‌های ایمنی ذاتی شامل: نوتروفیل، رده سلولی ماکروفاژ-منوسیت، سلول‌های دندریتیک نابالغ (iDCs)، سلول‌های دندریتیک (DCs) سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و سلول‌های ایمنی اختصاصی شامل لنفوسیت‌های B و T اختصاصی آنتی‌ژن و سایر سلول‌ها. این سلول‌ها توسط ساختارهای خارجی‌شان تشخیص داده می‌شوند. این ساختارها نقش هر سلول در پاسخ ایمنی را تعیین می‌کنند. Act1 در محل عفونت آغاز می‌شود و پاسخ‌های ذاتی را شامل می‌شود. در مرحله اول پاسخ ایمنی ذاتی شروع می‌شود و با فعال شدن کمپلمان قسمت «a» آن‌ها مانند C3a، C4a و C5a آزاد می‌شود تا باعث جذب سلول‌های ایمنی به محل عفونت می‌شود. نوتروفیل‌ها و سپس ماکروفاژهای فعال‌شده به طور مستقیم علیه میکروب‌ها فعالیت می‌کنند. اینتروفرون نوع یک مانع تکثیر ویروس‌ها می‌شود و سلول‌های NK را فعال می‌کند، همچنین ایجاد پاسخ توسط سلول‌های T را نیز تسهیل می‌کند. سلول‌های NK در مراحل اولیه پاسخ به عفونت و کشتن سلول‌های عفونی‌شده با ویروس و سلول‌های تومور نقش دارند. سلول‌های NK در مرحله دوم پاسخ ایمنی، سلول‌هایی که دارای آنتی‌بادی روی سطح خود هستند را می‌کشد (سیتوتوکسیته سلولی وابسته به آنتی‌بادی (ADCC). سلول‌های دندریتیک مانند پلی بین پاسخ ایمنی ذاتی و پاسخ ایمنی اختصاصی آنتی‌ژن هستند و این کار را به وسیله ترشح سیتوکین‌ها و انتقال آنتی‌ژن‌های فاگوسیته‌شده و پینوسیتوزیته‌شده به غدد لنفاوی، به عنوان سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC)، انجام می‌دهند که می‌تواند باعث شروع پاسخ ایمنی اختصاصی شود. مرحله دوم پاسخ ایمنی در غدد لنفاوی یعنی جایی که سلول‌های دندریتیک بالغ آنتی‌ژن‌ها را به لنفوسیت‌های T ارائه می‌دهند شروع می‌شود. با توجه به نوع سیتوکین‌های تولیدشده توسط سلول‌های دندریتیک و سلول‌های T، پاسخ ایمنی می‌تواند به سمت پاسخ التهابی موضعی (TH1 , TH17) یا آغاز پاسخ هومورال و سیستمیک (TH2) پیش برود. سلول‌های T از طریق ترشح سیتوکین‌ها یک نقش مرکزی در فعال شدن و کنترل (کمک کردن به) پاسخ التهابی مؤثر، برای ارائه آنتی‌ژن به سلول‌های اختصاصی آنتی‌ژن، و سلول‌های پلاسما برای تولید آنتی‌بادی افزایش می‌یابد. در Act3 سلول‌های T و سلول‌های B تعداد آنها افزایش می‌یابد و در نهایت به سلول‌های افکتور و پلاسما تمایز می‌یابند تا پاسخ‌های ایمنی سلولی اختصاصی آنتی ژن و آنتی بادی را ارائه کنند. سلول‌های B، سلول‌های دندرتیک و ماکروفاژها در جهت فعالیت به عنوان APC تقویت می‌شوند. بعضی از سلول‌های B و T به سلول‌های خاطره تبدیل می‌شوند تا بتوانند در آینده به عفونت سریع‌تر و مؤثرتر پاسخ دهند. عملکرد اختصاصی سلول‌ها، واکنش بین لیگاندها و رسپتورها در سلول‌ها و سیتوکین‌ها باعث شکل گرفتن این پاسخ ایمنی می‌شوند.

APC، سلول عرضه کننده آنتی‌ژن؛ DC، سلول دندریتیک؛ GI، گاستروابنتستینال؛ IDC، سلول دندریتیک نابالغ؛ IFN، اینترفرون؛ IL، اینترلوکین، ILC، سلول‌های لنفوئیدی ذاتی؛ MAIT، سلول T غیروارپان وابسته به مخاط، MHC، کمپلکس سازگارسنجی بزرگ؛ NK، سلول کشنده طبیعی؛ PAMPR، گیرنده الگوی ملکولی مرتبط با پاتوژن؛ TH، سلول T کمکی؛ TNF، فاکتور نکروز دهنده توموری؛ Treg، سلول‌های T تنظیمی

زیستگاه خودش یا کنترل سایر عفونت‌ها کافی نیست. در طی دوره زمانی موردنیاز جهت آغاز پاسخ ایمنی اختصاصی آنتی ژن جدید، عفونت‌ها می‌توانند رشد کرده، گسترش یابند و سبب بیماری شوند. پیشرفت بیماری به وسیله ترکیب میکروبی و ایمونوپاتوژنز که در نتیجه عفونت آغاز شده است تعیین می‌شود. هرچه عفونت پیشرفت کرده و تثبیت شود ایمونوپاتوژنز بیشتری اتفاق خواهد افتاد. خاطره ایمنی ایجادشده توسط عفونت قبلی یا واکسیناسیون می‌تواند سریعاً به اندازه کافی فعال شود تا اغلب عفونت‌ها را قبل از بروز علائم کنترل نماید.

پاسخ‌های ضدباکتریایی

شکل ۱-۷ پیشرفت پاسخ ایمنی محافظت‌کننده علیه باکتری‌ها را نشان می‌دهد. پاسخ ایمنی با فعال شدن پاسخ‌های ایمنی ذاتی و پاسخ التهابی به صورت موضعی شروع می‌شود و با ایجاد پاسخ‌های فاز حاد و اختصاصی آنتی‌ژن به صورت سیستمیک ادامه می‌یابد. مهمترین پاسخ‌های ضدباکتریایی میزبان شامل عملکرد سدهای محافظتی، پپتیدهای ضدمیکروبی، کشتار فاگوسیستیک توسط نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها، آنتی‌بادی‌های آنتی توکسین و اوپسونیزه کننده می‌باشند. آنتی‌بادی‌ها و



شکل ۱-۷. پاسخ‌های ضد باکتریایی به حمله. دوره زمانی از موضع (چپ) به غده لنفاوی (راست) شروع می‌شود و سپس همانطور که بالای شکل نشان داده شده مجدداً برمی‌گردد. در ابتدا پاسخ‌های ذاتی غیراختصاصی آنتی‌ژن جذب شده و پاسخ‌های نوتروفیل پلی‌مورفونوکلئر (PMN) و ماکروفاژ (Mθ) را تحریک می‌گردد. سلول‌های اپی‌تلیال و سایر سلول‌ها پپتیدهای ضدمیکروبی تولید می‌کنند (نشان داده نشده است). سلول‌های دندریتیک (DCs) بالغ شده آنتی‌ژن را به غده لنفاوی ارائه می‌کنند تا پاسخ‌های ایمنی اولیه (TH17، TH1، IgM، IgG) فعال شوند. سلول‌های TH1 و TH17 به محل عفونت حرکت می‌کنند تا کمک سایتوکاینی فراهم سازند. سپس وقتی آنتی‌ژن از طریق لنف به غده لنفاوی رسید، پاسخ‌های آنتی‌بادی سیستمیک TH2 گسترش پیدا می‌کنند. Apc، سلول عرضه کننده آنتی‌ژن؛ cTL، لنفوسیت T سایتوتوکسیک؛ Ig، ایمنوگلوبولین؛ IFN-γ، اینترفرون گاما؛ IL، اینترلوکین؛ TGF-β، فاکتور رشد بتا ترانسفورمینگ؛ TH، سلول T کمکی؛ TNF-α، فاکتور آلفا نکروزیس تومور.

کمپلمان‌ها برداشت میکروب‌ها توسط فاگوسیت‌ها (اوپسینوزاسیون) و TH17 را تسهیل می‌کنند و باعث افزایش پاسخ سلول‌های T CD4 TH1 و در نهایت تنظیم عملکرد خودشان می‌شوند. یک خلاصه‌ای از پاسخ ضدباکتریایی در کادر ۲-۷ نشان داده شده است.

آغاز پاسخ

پاسخ‌های مختلف زیادی در طی مراحل اولیه عفونت باکتریایی که بوسیله ساختار سطحی و متابولیت‌های باکتری‌ها، استرس و آسیب ایجاد شده در بافت آغاز شده‌اند، عمل می‌کنند. در طی عفونت پوست یا غشاهای مخاطی، سلول‌های اپی‌تلیال، سلول‌های لانگرهانس (پوست) یا DCs نابالغ (iDCs) و ماکروفاژهای بافتی به ملکول‌های کوچک (مثلاً آدنوزین تری فسفات [ATP])، پروتئین‌های هسته‌ای، پروتئین‌های سایتوسولیک) آزاد شده توسط آسیب سلولی با گیرنده‌های الگوی ملکولی مرتبط با آسیب (DAMP)، پاسخ می‌دهند. ملکول‌های دیواره سلول باکتریایی (اسیدتایکوئیک، اسیدلیپوتایکوئیک و قطعات پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم مثبت و لیپید A لیپوپلی‌ساکارید (Lps) باکتری‌های گرم منفی) متصل شده و گیرنده‌های الگوی ملکولی مرتبط با پاتوژن (PAMP) را فعال می‌کنند (جدول ۲-۸ و شکل ۴-۸ را ببینید). لیپید A (اندوتوکسین) به TLR4 و سایر گیرنده‌های PAMP متصل شده و فعال کننده بسیار قوی DCs، ماکروفاژها، سلول‌های B و سایر سلول‌های انتخابی (مانند سلول‌های اپی‌تلیال و اندوتلیال) می‌باشد. سلول‌های لنفوئید ذاتی و سلول‌های T طبیعی (سلول‌های MAIT، NkT و سلول‌های γgT

کادر ۲-۷. خلاصه‌ای از پاسخ‌های ضد باکتریایی.
پروتئین‌ها و پپتیدهای ضدمیکروبی
دیفنسین‌ها و سایر پپتیدها غشاءها را تخریب می‌کنند. ترانسفرین، لاکتوفرین و سایر پروتئین‌های جمع‌کننده آهن و سایر یون‌های ضروری.
کمپلمان
تولید پروتئین‌های کموتاکتیک و پروتئین‌های آنافیلاتوکسیک (C5a ،C3a) اپسونیزاسیون باکتری‌ها (C3b). افزایش مرگ و میر باکتری‌های گرم منفی. فعال‌سازی سلول‌های B (C3d).
نوتروفیل
سلول فاگوسیته کننده ضد باکتریایی مهم. کشتار توسط مکانیسم‌های وابسته به اکسیژن و غیر وابسته به اکسیژن.
دندرتیک سل‌ها
تولید سایتوکین‌های فاز حاد (TNF-α,IL-6,IL-1);IL-23,IL-12;IFN-α عرضه آنتی‌ژن به T سل‌های CD4 و CD8 آغاز پاسخ‌های ایمنی در سلول‌های T بکر.
ماکروفاژهای فعال‌شده (M1)
سلول فاگوسیته کننده ضد باکتریایی مهم. کشتار به وسیله مکانیسم‌های وابسته به اکسیژن و غیر وابسته به اکسیژن. تولید IL-1، IL-6 و IL-12، TNF−α و IL-23 و IFN−α فعال کردن پاسخ‌های التهابی و فاز حاد. عرضه آنتی‌ژن به سلول TCD4.
سلول‌های T
پاسخ γ/δ T به متابولیت‌های باکتریایی. سلول‌های کشنده طبیعی (NKT) به CD1 عرضه شده از گلیکولیپیدهای مایکوباکتریوم پاسخ می‌دهند. پاسخ‌های TH1-CD4 برای باکتری مخصوصاً عفونت‌های حاصل از باکتری‌های درون سلولی هم مهم هستند. پاسخ TH2CD4 برای تولید آنتی‌بادی مهم هستند. پاسخ TH17CD4 برای فعال کردن نوتروفیل‌ها مهم می‌باشد.
آنتی‌بادی
اتصال به ساختارهای سطحی باکتری‌ها (فیمبریه، لیپوتایکوئیک اسید و کپسول). مهار اتصال اپسونیزاسیون باکتری برای عمل بیگانه خواری افزایش عملکرد کمپلمان افزایش پالایش باکتری‌ها خنثی سازی سموم و آنزیم‌های سمی
IFN-α، اینترفرون آلفا؛ IL، اینترلوکین؛ TFN-α، فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا، MAIT، واریانت سلول T مرتبط با مخاط، NKT، سلول T کشنده طبیعی؛ TH، سلول T کمکی

ساکن در بافت نیز پاسخ می‌دهند، تولید سایتوکین‌ها کرده و با تولید پپتید ضدمیکروبی پاسخ‌های سلولی را به وسیله تولید اینترلوکین ۱۷ (IL-17)، IL-22 و اینترفرون گاما (IFN-γ) مجدداً تقویت می‌نمایند. **سلول‌های T γ@** در بافت متابولیت‌های آمینی فسفوریله شهد تولید شده توسط اغلب باکتری‌ها را حس می‌کنند. **سلول‌های NKT** به گلیکوپپتیدهای باکتریایی ارائه شده بر روی ملکول‌های CD1 توسط DCs پاسخ می‌دهند و **سلول‌های MAIT** به مشتقات ویتامین B تولید شده توسط بسیاری از باکتری‌ها پاسخ می‌دهند. سلول‌های T طبیعی به PAMPs نیز پاسخ می‌دهند.

سلول‌های B1 B نیز از طریق اتصال ساختارهای تکراری سطح باکتری‌ها به گیرنده‌های PAMP و به ایمونوگلوبولین سطح آنها فعال می‌شوند. سلول‌ها تکثیر می‌یابند و تولید ایمونوگلوبولین M (Ig) می‌کنند. این پاسخ به ویژه برای پلی‌ساکاریدهای کپسولی مهم است.

پپتیدهای ضدمیکروبی از جمله دیفنسین‌ها توسط سلول‌های اپی‌تلیال فعال شده، نوتروفیل‌ها و سایر سلول‌ها آزاد می‌شوند تا پوست و سطوح مخاطی - اپی‌تلیالی را محافظت نماید. آزاد شدن آنها توسط IL-17 و IL-22 تولید شده توسط سلول‌های T طبیعی و پاسخ‌های TH-17 مجدداً تقویت می‌شود. پپتیدهای ضدمیکروبی برای تنظیم گونه‌های باکتری‌ای موجود در مجرای معدی-روده‌ای بسیار مهم هستند. علاوه بر این، پپتیدهای جمع‌آوری کننده به عنوان بخشی از پاسخ‌های التهابی به مصرف کننده‌های یون‌های فلزی ضروری از قبیل آهن و روی آزاد می‌شوند تا رشد میکروبی را محدود کنند.

علاوه بر این، ساختارهای سطحی باکتری، مسیرهای فرعی یا لکتینی کمپلمان را که در سرم و مایعات بین بافتی وجود دارند، فعال می‌کنند. **سیستم کمپلمان** یک پاسخ بسیار زودرس و مهم علیه باکتری‌هاست (فصل ۸ را ببینید انیمیشن ۱). **مسیر فرعی کمپلمان (پروپردین)** (Alternative complement pathway (properdin)) در غیاب آنتی‌بادی و توسط تیکوئیک اسید، پپتیدوگلیکان و لیپوپلی‌ساکارید (LPS) فعال می‌شود. پروتئین متصل‌شونده به مانوز (Mannose-binding protein) می‌تواند **مسیر لکتینی کمپلمان** را فعال کند. سپس زمانی که ایمونوگلوبولین

M(Ig) یا IgG ظاهر شدند **مسیر اصلی کمپلمان (Classical Complement Pathway)** فعال می‌شود. هر سه مسیر در تولید C3 کانورتاز جهت شکستن C3 به C3a، C3b و C3d و C5 کانورتاز برای شکستن C5 به C5a مشترک‌اند. کمپلکس حمله به غشا (MAC) می‌تواند مستقیماً باکتری‌ها گرم منفی را بکشد ولی روی گرم مثبت‌ها اثر کمتری دارد (پپتیدوگلیکان ضخیم در دیواره سلولی گرم مثبت‌ها آنها را از کمپلمان محافظت می‌کند). نایسریا به دلیل وجود ساختار لیپاولیگوساکارید در غشای خارجی خود به طور خاصی به کمپلمان حساس است. کمپلمان باعث تسهیل حذف همه باکتری‌ها می‌شود با تولید:

۱. **فاکتورهای کموتاکسی (C3a و C5a)** برای جذب نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها به محل عفونت.
۲. **آنافیلاتوکسین‌ها (C3a، C5a و به میزان کمتری C4a)** برای تحریک ماست‌سل‌ها و ترشح هیستامین و در نتیجه افزایش نفوذپذیری عروقی و امکان دسترسی به مکان عفونت.
۳. **اپسونین‌ها (C3b)** که به باکتری‌ها متصل می‌شوند و باعث افزایش فاگوسیتوز آنها می‌شوند.
۴. **فعال‌کننده سلول B (C3d)** برای افزایش تولید آنتی‌بادی.

اتصال PAMPها به گیرنده‌های خود منجر به فعال شدن التهاب و تقویت تولید سیتوکین (شامل **سایتوکین‌های فاز حاد مانند IL-6، IL-1 و TNF-α**) و ایجاد پاسخ حفاظتی و بلوغ سلول‌های دندریتیک می‌شود. اینفلامازوم (Inflammasom) به منظور افزایش التهاب موضعی، شکستن IL-1β و IL-18 را تقویت می‌کنند (**شکل ۵-۸ را ببینید**).

IL-1 و TNF-α پاسخ التهابی موضعی را به وسیله تحریک تغییرات در بافت، فعال‌سازی سلول‌های ماست در جهت تولید هیستامین و تحریک نشت مایع به وسیله تسهیل جذب و دیاپدز نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها به محل فعال‌سازی این سلول‌ها و همچنین فعال سازی پاسخ‌های سیستماتیک، تحریک می‌نمایند.

IL-1 و TNF-α تب‌زاهای درونی (Endogenous pyrogens) هستند که باعث القاء تب و **پاسخ فاز حاد (Acute-phase response)** می‌شوند. **پاسخ فاز حاد** می‌تواند به وسیله التهاب، صدمه به بافت، پروستاگلاندین E2 و اینترفرون‌های تولیدشده در طی عفونت آغاز گردد. پاسخ فاز حاد باعث تقویت واکنش‌هایی می‌شود که از سیستم ایمنی بدن محافظت می‌کنند، از جمله این واکنش‌ها، تب، آنورکسی (Anorexia)، خواب‌آلودی، تغییرات متابولیتی و تولید پروتئین‌ها را می‌توان نام برد. پروتئین‌های فاز حاد که در درون سرم تولید و ترشح می‌شوند شامل پروتئین راکتیو_C، (C-reacteve proteins) ترکیبات کمپلمان، پروتئین‌های کوآگلوتیناسیون، پروتئین‌های متصل‌شونده به LPS، مهارکننده‌های پروتئاز، پروتئین‌های انتقالی و پروتئین‌های اتصالی است. **پروتئین واکنشی-C** با پلی ساکاریدهای تعدادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها کمپلکس می‌شود و باعث فعال شدن کمپلمان و تسهیل از بین رفتن این ارگانیسم‌ها از بدن، از طریق افزایش فاگوسیتوز می‌شود. پروتئین‌های فاز حاد باعث تقویت پاسخ ایمنی ذاتی علیه عفونت می‌شوند.

این فعالیت‌ها سبب آغاز التهاب حاد موضعی می‌گردند. سپس در مویرگ‌ها پخش می‌شود و با افزایش جریان خون باعث افزایش ورود مواد ضدمیکروبی به محل عفونت می‌شود. افزایش نفوذپذیری و تغییر ملکول‌های سطحی رگ‌ها، باعث افزایش جریان پروتئین‌های پلاسما و جذب و تسهیل ورود لکوسیت‌ها به درون محل عفونت می‌شود. آسیب بافت باعث القاء تولید کینین و فاکتورهای خونی می‌شود (مانند فاکتور XII (فاکتور هاگمن)، برادی کینین و فیبرینوپپتیدها) که این فاکتورها در ایجاد التهاب نقش دارند. این فاکتورها در نفوذپذیری رگ‌ها نیز نقش دارند و برای لکوسیت‌ها کموتاکتیک می‌باشند. محصولات متابولیسم آراشیدونیک اسید نیز بر روی التهاب اثر می‌گذارند. سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) و ۵- لیپواکسیژناز، آراشیدونیک اسید را به ترتیب به **پروستاگلاندین و لکوترین‌ها** (Prostaglandins and leukotrienes) تبدیل می‌کنند که ضرورتاً می‌توانند جنبه‌های مختلف التهاب را واسطه‌گری کنند. التهاب می‌تواند به دنبال افزایش سریع در سطوح سرمی پروتئین‌های فاز حاد به ویژه پروتئین راکتیو-C (که در عرض ۲۴ تا ۴۸ ساعت هزار برابر می‌شود) و آمیلوئید سرم A رخ دهد. اگرچه این پروسه‌ها مفیدند ولی باعث ایجاد **درد، حرارت و ورم و ایجاد آسیب بافتی** می‌شوند. آسیب التهابی تا حدی توسط کمپلمان و ماکروفاژها نیز رخ می‌دهد، ولی اغلب توسط نوتروفیل ایجاد می‌شود.

iDCs، ماکروفاژها و سایر سلول‌های رده ماکروفاژ نیز با تولید سایتوکین‌های فاز حاد IL-23، و IL-12 به PAMPs پاسخ می‌دهند. IL-23 و IL-12 پلی به پاسخ‌های سلول T اختصاصی آنتی‌ژن زده و به ترتیب پاسخ‌های سلول‌های TH17 خاطره‌ای و پاسخ‌های TH1 را فعال می‌کنند.

پاسخ‌های فاگوسیتی

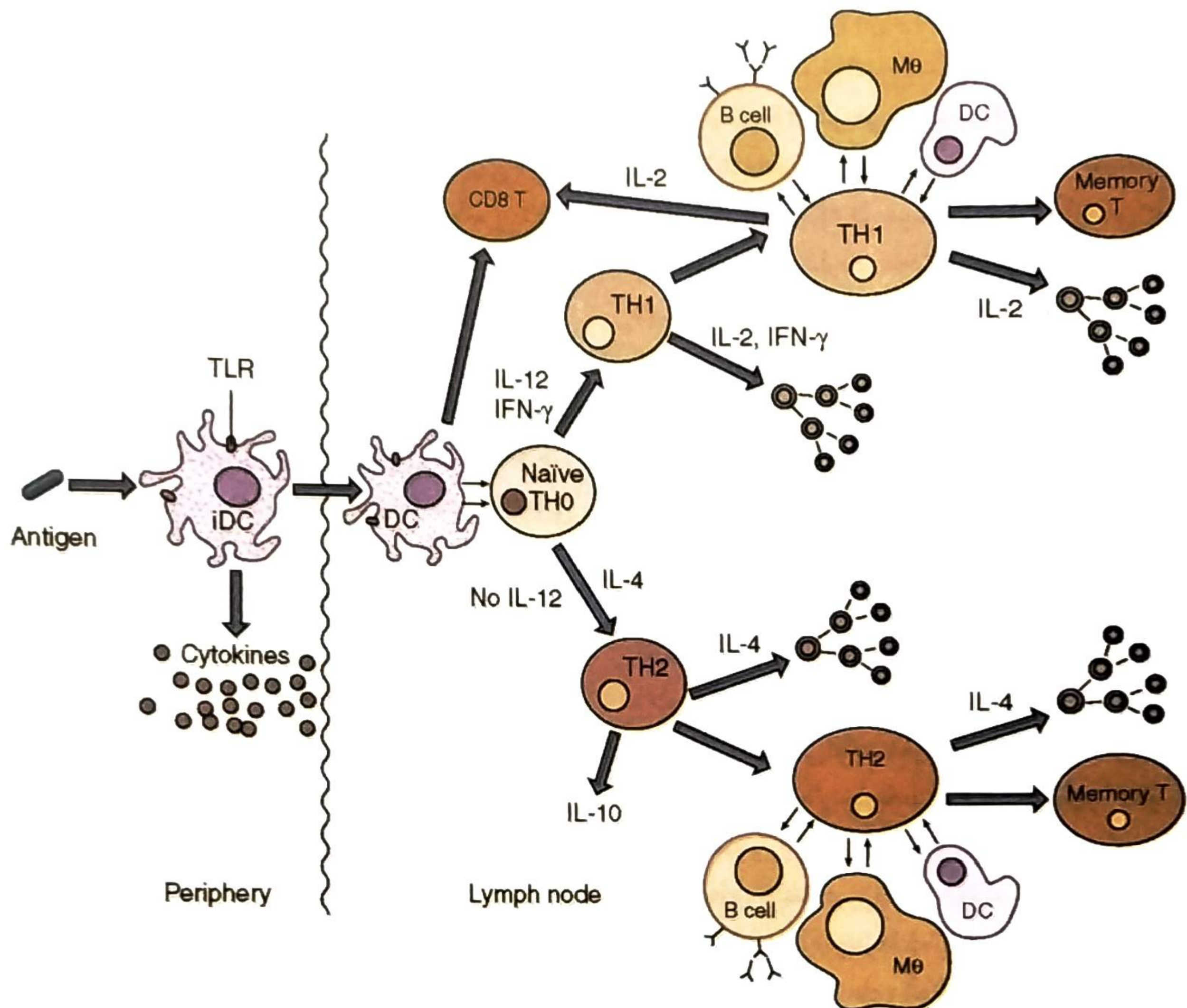
C5a، C3a، محصولات باکتریایی (مثلا فورمیل- متیونیل- لوسیل - فنیل آلانین (Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine [f-met-lea-phe]) و کموکین‌ها توسط سلول‌های اپی‌تلیال، سلول‌های لانگرهانس و سایر سلول‌ها در پوست و اپی‌تلیوم مخاطی می‌گردند و جذب‌کننده‌های شیمیایی قوی برای نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و در نهایت پاسخ لکوسیت‌ها می‌باشند. کموکاین‌ها و فاکتور نکروز دهنده توموری (TNF-α) سبب پوشانده شدن سلول‌های اندوتلیال آستر مویرگ‌ها (نزدیک محل التهاب) شده و به وسیله ظاهر شدن مولکول‌های چسبنده کمپلمان ("Velcro" مولکولی (Molecular"Velcro")) منجر به عبور لکوسیت‌ها و تقویت دیاپدز می‌گردند (شکل ۶-۸ و انیمیشن ۱-۱۰ را ببینید). نوتروفیل‌های چند هسته‌ای (PMNs)، مونوسیت‌ها و بندرت ائوزینوفیل‌ها اولین سلول‌هایی هستند که در پاسخ به عفونت به محل عفونت می‌رسند. عملکرد آن‌ها بعداً توسط ماکروفاژها دنبال می‌شود. فراخوانی باند فرم‌های نابالغ نوتروفیل‌ها از مغز استخوان در طی عفونت به وسیله شیفت به چپ در شمارش کلی سلول‌های خونی مشخص می‌گردد. نوتروفیل‌ها توسط ماکروفاژها و پاسخ TH17 فراخوانی و فعال می‌شوند و سلول‌های دندریتیک نیز توسط IFN-γ تولید شده توسط سلول‌های NK، NKT و پاسخ TH1 فعال می‌شوند.

اتصال باکتری به نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها توسط گیرنده‌هایی برای کربوهیدرات‌های باکتریایی (لکتین‌ها [پروتئین‌های متصل شونده به قند اختصاصی])، گیرنده‌های فیبرونکتین (به ویژه برای استافیلوکوکوس اورئوس)، گیرنده‌هایی برای اپسونین‌ها شامل کمپلمان (C3b)، پروتئین راکتیو- C، پروتئین متصل شونده به مانوز و بخش FC آنتی‌بادی انجام می‌شود. میکروب‌ها وارد واکوئل فاگوسیتیک می‌شوند و این واکوئل با لیزوزوم‌های اولیه (ماکروفاژها) یا گرانول‌ها (PMNs) ترکیب شده و سبب غیر فعال‌سازی و هضم محتویات واکوئل می‌گردد (شکل ۷-۸ و کادر ۴-۸ را ببینید).

نوتروفیل‌ها میکروب‌های فاگوسیت‌شده را از طریق کشتار وابسته به اکسیژن با پراکسیدهیدروژن، یون سوپراکسید و یون‌های هیپوکلروس را می‌کشد. نوتروفیل همچنین می‌تواند کشتار غیر وابسته به اکسیژن (Oxygen-independent Killing) در نتیجه ادغام فاگوزوم با گرانول‌های آزروفیلیک حاوی پروتئین‌های کاتیونی (مانند کاتپسین G) و گرانول‌های اختصاصی حاوی لیزوزیم و لاکتوفرین را واسطه‌گری نماید. این پروتئین‌ها باکتری‌های گرم منفی را با تخریب غشاء سلولی آن‌ها از بین می‌برند ولی اثر کمتری روی باکتری‌های گرم مثبت که عمدتاً توسط مکانیسم وابسته به اکسیژن از بین می‌روند، دارند. نیتریک اکساید (Nitric Oxide) تولید شده توسط نوتروفیل‌ها و ماکروفاژهای فعال دارای فعالیت ضدمیکروبی هستند و همچنین یک مولکول پیام‌رسان ثانویه بزرگ پاسخ التهابی و سایر پاسخ‌ها را افزایش می‌دهد.

نوتروفیل‌ها در چندین مسیر در التهاب شرکت می‌کنند. پروستاگلاندین‌ها و لکوترین‌ها که نفوذپذیری واکوئل‌ها را افزایش می‌دهند، آزاد می‌شوند و سبب تورم (ادم) و تحریک گیرنده‌های درد می‌شوند. علاوه بر این، در طی فاگوسیتوز ممکن است محتویات گرانول‌ها نشت کرده و سبب آسیب بافتی شود. نوتروفیل‌ها دارای طول عمر کوتاه می‌باشند و در طی مرگ نوتروفیل‌ها یک شبکه DNA چسبناک (دام خارج‌سلولی نوتروفیل) آزاد می‌گسترانند و چرک تولید می‌شود.

برعکس نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها عمر طولانی دارند اما سلول‌ها باید توسط IFN-γ (بهترین) فعال شوند (عصبانی شوند) که در نتیجه آن میکروب‌های فاگوسیته‌شده را بکشند. فاکتور تحریک‌کننده کلونی گرانولوسیت - ماکروفاژ (GM-CSF)، TNF-α و لنفوتوکسین (TNF-β) فعالیت ضدمیکروبی را پیدا می‌کنند (آنها را فعال نگه دارند). در ابتدای عفونت IFN-γ توسط سلول‌های NK و NKT تولید می‌شوند و بعد از آن به وسیله سلول‌های CD4T تولید می‌گردند. ماکروفاژهای طحال (splenic macrophage) نقش مهمی در پاکسازی باکتری‌ها مخصوصاً باکتری‌های کپسول دار از خون دارند. افراد بدون طحال



شکل ۲-۷. شروع و گسترش پاسخ‌های ایمنی اختصاصی. سلول‌های دندریتیک نابالغ (iDCs) در محل عفونت اجزاء میکروبی را بدست می‌آورد و رسـپتورهای شـبیه به Toll (TLRs) و سـایر گیرنده‌های الگوی پاتوژن به لیگاند خودشـان متصل شده و سبب فعال‌سازی سلول‌های دندرتیک (DCs) می‌شوند و در نتیجه آن سایتوکین‌ها تولید کرده، بالغ شده و به سمت غده لنفاوی حرکت می‌کنند و آنتی‌ژن را به سـلول‌های T بکر عرضه می‌کنند و منجر به آغاز پاسـخ اختصاصی آنتی‌ژن و پاسخ مرتبط با سـایتوکین می‌شوند. در طی پاسخ خاطره‌ای یا ثانویه سـلول‌های B، ماکروفاژها و سـلول‌های DC می‌تواند عرضه کننده آنتی‌ژن برای شروع پاسخ باشند. IL، اینترلوکین؛ IFN-γ، اینترفرون گاما؛ Mθ، ماکروفاژ؛ TH، سلول T کمکی.

(بـه طور مادرزادی یا در اثر جراحی) حساسـیت زیادی به پنومونی، مننژیت و سایر تظاهرات ناشی از استرپتوکوکوس پنومونیـه، نایسـریا مننژیتیدیـس و سـایر باکتری‌های کپسول‌دار و مخمرها دارند.

پاسخ اختصاصی آنتی‌ژن در درگیری باکتریایی

در طی بلعیده شدن باکتری و تحریک TLRs به وسیله ترکیبات باکتریایی سـلول‌های لانگرهانس و سـلول‌های دندریتیک نابالغ (iDCs) به سلول‌های بالغ تبدیل می‌شوند و سبب توقف فاگوسـیتوز می‌شوند و به طرف غدد لنفاوی حرکت می‌کنند تا آنتی‌ژن را پردازش کنند و به سلول‌های T عرضه کنند (شکل ۲-۷). حرکت DC به سمت غده لنفاوی ممکن اسـت ۱ تا ۳ روز طول بکشد. سلول‌های دندریتیک نیز دندریت‌ها را به درون مجرای روده وارد می‌کنند تا فلور نرمال را بررسی کنند. پپتیدهای آنتی‌ژنی (دارای بیش از ۱۱ اسیدآمینه) تولید شده از پروتئین‌های فاگوسیت شده (مسیر اگزوژن) به مولکول‌های کمپلکس بزرگ سـازگار نسجی (MHC) کلاس II متصل می‌شـوند و توسـط سلول‌های

عرضه کننده آنتی‌ژن (APCs) به **سلول‌های CD4TH0** بکر عرضه می‌شوند. TH0 اولین مرحله یعنی گسترش عمومی سلول‌های ایمنی مورد نیاز برای پاسخ به عفونت را تأمین می‌کند. سلول‌های TCD4 به وسیله ترکیبی از این موارد فعال می‌شود: (۱) پپتید آنتی‌ژنی در کمپلکس MHC کلاس II با گیرنده آنتی‌ژنی سلول T (TCR) و CD4، (۲) سیگنال‌های کمکی تحریکی حاصله از واکنش مولکول‌های CD28 روی سلول‌های T با مولکول B7 روی سلول دندریتیک، فعال می‌شوند؛ (۳) IL-6 و سایر سیتوکین‌های تولیدشده توسط DC. سلول‌های TH0 تولید IL-2، IFN-γ، IL-4 می‌نمایند. به طور خودبخودی مولکول‌های باکتریایی با ساختارهای تکراری (مانند پلی‌ساکاریدهای کپسولی) بر روی سلول‌های B که IgM و IgD خاص آنتی‌ژنی را روی سطح خود بروز می‌دهند اثر می‌گذارند و باعث فعال شدن و رشد این سلول‌ها و تولید IgM توسط آن‌ها می‌شوند. پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی میکروبی مخصوصاً LPS و همچنین جزء C_3d کمپلمان، سلول‌های B را فعال نموده و پاسخ‌های آنتی‌بادی IgM اختصاصی را تقویت می‌نمایند. تورم غدد لنفاوی نشانه‌ای از فعال شدن لنفوسیت در پاسخ به چالش آنتی‌ژنی می‌باشد.

تبدیل سلول‌های TH0 به TH17 و TH1 باعث گسترش پاسخ ایمنی میزبان می‌شود. سایتوکین‌های فاز حاد مانند IL-1 و TNF-α به همراه TGF-β توسعه **سلول‌های CD4 TH17** را تقویت می‌کنند. سایتوکین‌های فاز حاد علی‌رغم افزایش اثر TGF-β طوفان سایتوکینی التهابی سریع را به وسیله **سلول‌های T، CD4 TH17** برمی‌انگیزند و با فعال‌سازی سلول‌های اپی‌تلیال و نوتروفیل‌ها پاسخ‌های التهابی را فعال می‌کنند. سلول TH17 خاطره‌ای که به وسیله IL-23 فعال می‌شوند. سلول‌های TH17 تولید IL-17 و TNF-α می‌کنند تا سلول‌های اپی‌تلیال و نوتروفیل‌ها را فعال کنند و تولید پپتیدهای ضدمیکروبی را تقویت کنند. پاسخ‌های TH17 برای پاسخ اولیه ضدباکتریایی و ضدمایکوباکتریومی مهم است. تعادل پاسخ‌های TH17 و Treg نیز در تنظیم جمعیت نرمال فلورای روده مهم است. سلول‌های دندریتیک تولید کننده IL-12، پاسخ‌های TH1 را تقویت می‌کنند.

سلول‌های CD4 TH1 (۱) باعث تحریک و تقویت پاسخ‌های التهابی می‌گردند (مانند فعال‌سازی IFN-γ ماکروفاژ) و سبب رشد سلول‌های B و T (IL-2) برای افزایش پاسخ ایمنی می‌شوند، و (۲) سلول‌های B را برای تولید آنتی‌بادی‌های متصل شونده به کمپلمان (IgM، IgG در طی تغییر کلاس) و بلوغ به سلول‌های پلاسما و سلول‌های خاطره‌ای تحریک می‌کنند. این پاسخ‌ها در فاز اولیه دفاع ضد باکتریایی ضروری می‌باشد. پاسخ‌های TH1 نیز برای عفونت‌های باکتریایی درون سلولی و مایکوباکتریوم‌ها که از دسترس آنتی‌بادی پنهان می‌باشند ضروری است. IFN-γ، ماکروفاژ را به منظور از بین بردن میکروب‌های فاگوسیت شده فعال می‌نماید. تحریک مزمن T سل‌های CD4 TH1 توسط ماکروفاژهای بیان کننده آنتی‌ژن میکروبی (هسیتوپلاسمایی یا مایکوباکتریومی) و تولید کننده IFN-γ و TNF-α ممکن است باعث تغییر شکل دادن ماکروفاژها به سلول‌های اپی تلیالی و سلول‌های غول آسا گردند که می‌توانند اطراف عفونت را بگیرند و تولید گرانولوما کنند. گرانولوماها همچنین از ظهور عفونت‌های درون‌سلولی جلوگیری می‌کنند زیرا میکروب می‌تواند از پاسخ‌های ضدمیکروبی فرار نموده (مانند **مایکوباکتریوم توبرکلوزیس**)، ماکروفاژها فعال نمی‌شوند و نمی‌توانند آنها را بکشند (ماکروفاژهای آلوئلار نرمال)، یا نقص ژنتیکی مانع از تولید مواد ضدمیکروبی واکنشی اکسیژن در بیماری گرانولوماتوز مزمن می‌شود. سلول‌های CD8T *پاکسازی عفونت‌های داخل سلولی را به وسیله تولید سایتوکین‌ها تسهیل می‌کنند اما برای ایمنی ضدباکتریایی ضروری نیست.*

پاسخ‌های **T سل CD4 TH2** در غیاب IL-12 در غدد لنفاوی دورتر رخ می‌دهد. این پاسخ‌ها همچنین توسط سلول‌های دندریتیک و بعداً توسط سلول Bعرضه کننده آنتی‌ژن شروع می‌شوند. پاسخ‌های TH2 همزمان با پاسخ‌های TH1 می‌توانند وقتی آنتی ژن در مایع لنفاوی به غدد لنفاوی غیر از غده لنفاوی زهکشی‌کننده تحویل داده می‌شود، اتفاق بیافتد. سلول‌های دندرتیک به عنوان بازرس‌های تمیزکننده نیز عمل نموده و باعث تقویت پاکسازی پروتئین اضافی یا آسیب‌دیده می‌شوند. این مشابه نوعی پاسخ که در طی تزریق توده‌ای از آنتی ژن برای واکسن غیر فعال‌شده اتفاق می‌افتد است. اتصال آنتی‌ژن به

آنتی‌بادی سطح سلول‌های B باعث فعال کردن سلول‌های B و همچنین افزایش برداشت، پردازش آنتی‌ژن و عرضه پپتیدهای آنتی‌ژنی روی مولکول‌های MHC کلاس II به سلول CD4 TH2 می‌شود. سلول TH2 تولید IL-4، IL-5، IL-6، IL-10 و IL-13 میکند که تولید IgG را افزایش می‌دهد و بسته به سایر فاکتورها سبب تولید IgE یا IgA می‌شود. سلول‌های CD4TFH گذرگاهی برای پاسخ‌های TH1 یا TH2 بوده که سبب تقویت تولید سلول خاطره‌ای و تمایز نهایی سلول‌های B به کارخانه‌های آنتی‌بادی پلاسما سل می‌شود.

سلول‌های T $CD4^+ CD25^+$ تنظیم کننده ($CD4^+$ ($CD25^+$ regulatory Tcell (Treg)) از فعال شدن نابجا سلول‌های T بکر یعنی پاسخ‌های شدید TH1 و TH2 جلوگیری می‌کنند و باعث گسترش بعضی از سلول‌های اختصاصی علیه آنتی‌ژن به سلول‌های T خاطره‌ای می‌شوند. فقط سلول‌های دندریتیک می‌توانند نقش مهاری سلول T تنظیمی را از بین ببرند که در نتیجه آن سلول T بکر فعال می‌شود.

آنتی‌بادی‌ها اولین دفاع علیه باکتری‌های خارج سلولی یا عفونت مجدد می‌باشند و سبب تقویت حذف باکتریها می‌گردند و از گسترش باکتری‌ها در خون جلوگیری می‌کنند. آنتی‌بادی برای تحریک فعال شدن کمپلمان، اپسونیزاسیون باکتری توسط فاگوسیتوز، مهار چسبندگی باکتری و خنثی کردن (غیرفعال‌سازی) اگزوتوکسین‌ها (مانند تتانواسپاسمین (Tetanospasmin)، سم بوتولینوم (Botulinum Toxin)) و دیگر پروتئین‌های سایتوتوکسیک تولید شونده توسط باکتری (مانند آنزیم‌های تخریب کننده) مهم می‌باشد. ایمن سازی به وسیله واکسن با اگزوتوکسین‌های غیر فعال (توکسوئیدها) روش‌های اولیه حفاظت علیه اثرات کشندگی بالقوه اگزوتوکسین‌ها می‌باشد.

آنتی‌بادی‌های **IgM** در پاسخ ضد میکروبی قبل از سایر آنتی‌بادی‌ها تولید می‌شوند (انیمیشن ۱-۱۰ را ببینید). IgM با اتصال به باکتری سبب فعال شدن آبشار کلاسیک کمپلمان می‌گردد که متعاقب آن دو فرآیند کشتار مستقیم باکتری‌های گرم منفی و پاسخ‌های التهابی راه‌اندازی می‌شود. معمولاً IgM تنها آنتی بادی تولید شونده علیه کربوهیدرات‌های کپسولی می‌باشد و اوپسینوزاسیون باکتری‌ها به وسیله کمپلمان را تقویت می‌کند. ماکروفاژهای طحالی وابسته به IgM به پلی‌ساکاریدهای کپسولی متصل می‌شوند و سبب فعال‌سازی کمپلمان‌شده و باکتری‌های دارای سلول را اوپسینه می‌کنند در نتیجه آنها می‌توانند شناسایی شده، فاگوسیته گشته و حذف می‌شود. اندازه بزرگ و مکانیسم‌های انتقالی محدودشده برای IgM توانایی گسترش آن به درون بافت را محدود می‌کند. IgM تولیده شده در پاسخ واکسن‌های پلی‌ساکاریدی (مثلاً برای **استرپتوکوکوس پنومونیه**) می‌توانند از باکتریمی جلوگیری کنند اما از عفونت حبابچه‌های ریه جلوگیری نمی‌کنند.

تقریباً یک هفته بعد پاسخ ایمنی سلول T موجب تمایز سلول‌های B و تغییر کلاس برای تولید **IgG** می‌شود. آنتی‌بادی‌های IgG، آنتی‌بادی غالب سرم به ویژه در برخورد مجدد است. آنتی‌بادی‌های IgG موجب تثبیت کمپلمان می‌شوند و باعث تحریک برداشت باکتری‌ها از طریق گیرنده‌های FC موجود بر روی ماکروفاژها می‌گردند. **IgA** آنتی‌بادی ترشحی اولیه و مهم برای حفاظت غشاهای مخاطی است. میزان زیادی از IgA ترشحی برای تنظیم جمعیت فلور نرمال آزاد می‌شود و اتصال باکتری‌ها و توکسین‌های آن‌ها را در سطوح سلول اپی تلیال خنثی می‌نماید.

پاسخ اولیه اختصاصی آنتی‌ژن به عفونت باکتریایی حداقل ۵ تا ۷ روز رخ می‌دهد. حرکت DC به غده لنفاوی ممکن است ۱ تا ۳ روز رخ دهد و به وسیله فعال شدن، توسعه و بلوغ پاسخ ادامه می‌یابد. در برخورد دوباره با عفونت سلول‌های T خاطره‌ای می‌توانند سریعا به عرضه آنتی‌ژن توسط DC، ماکروفاژ یا سلول‌های B پاسخ دهند. نه تنها DC، سلول‌های B خاطره‌ای می‌توانند به آنتی‌ژن پاسخ دهند و پاسخ ثانویه در طی ۲ تا ۳ روز رخ می‌دهد.

پاسخ ایمنی مخاطی، روده‌ای و پوست

غشاءهای مخاطی، روده و پوست در طی عبور نوزاد از کانال زایمان و بلافاصله پس از تولد با باکتری‌ها اشغال می‌شوند. پاسخ ایمنی بالغ شده و بین سلول‌های التهابی و تنظیمی در پاسخ به فلور نرمال تعادل ایجاد می‌کند.

فلور روده به طور ثابت از طریق سیستم‌های ایمنی و ذاتی بافت‌های لنفوئیدی وابسته به روده تنظیم می‌شوند

(شکل ۵-۷ را ببینید). به طور مشابه، پاسخ ایمنی نیز از طریق تعامل با فلور روده به عنوان سلول‌های تنظیمی که باعث محدود شدن التهاب و پاسخ‌های خود ایمنی (اتوایمیون) می‌شود تنظیم می‌گردد. سلول‌های دندریتیک، سلول‌های لنفوئیدی ذاتی، TH17, TH1, Treg و سایر سلول‌های T و سلول‌های B در پلاک‌های پیر و فولیکول‌های لنفوئیدی روده، باکتری‌های را در درون روده کنترل می‌کنند. این سلول‌ها و سایر رده‌های سلولی در روده، پپتیدهای ضدمیکروبی تولید می‌کنند و سلول‌های پلاسما در سیستم گوارشی IgA ترشح می‌کند تا ترکیب سالم باکتری‌ها حفظ شود. همچنین سلول‌های تنظیم‌کننده نیز از ایجاد پاسخ ایمنی علیه محتویات روده جلوگیری می‌کنند. تغییرات نرمال فلورای روده و یا تداخل آنها با سلول‌های ایمنی می‌تواند باعث ایجاد بیماری‌های التهاب روده‌ای شود. به عنوان مثال، عدم وجود و یا موتاسیون در گیرنده IL-23 و یا رسپتور NOD2 برای پپتیدوگلیکان، D2 احتمال ایجاد نوع خاصی از بیماری کرون را بالا می‌برد.

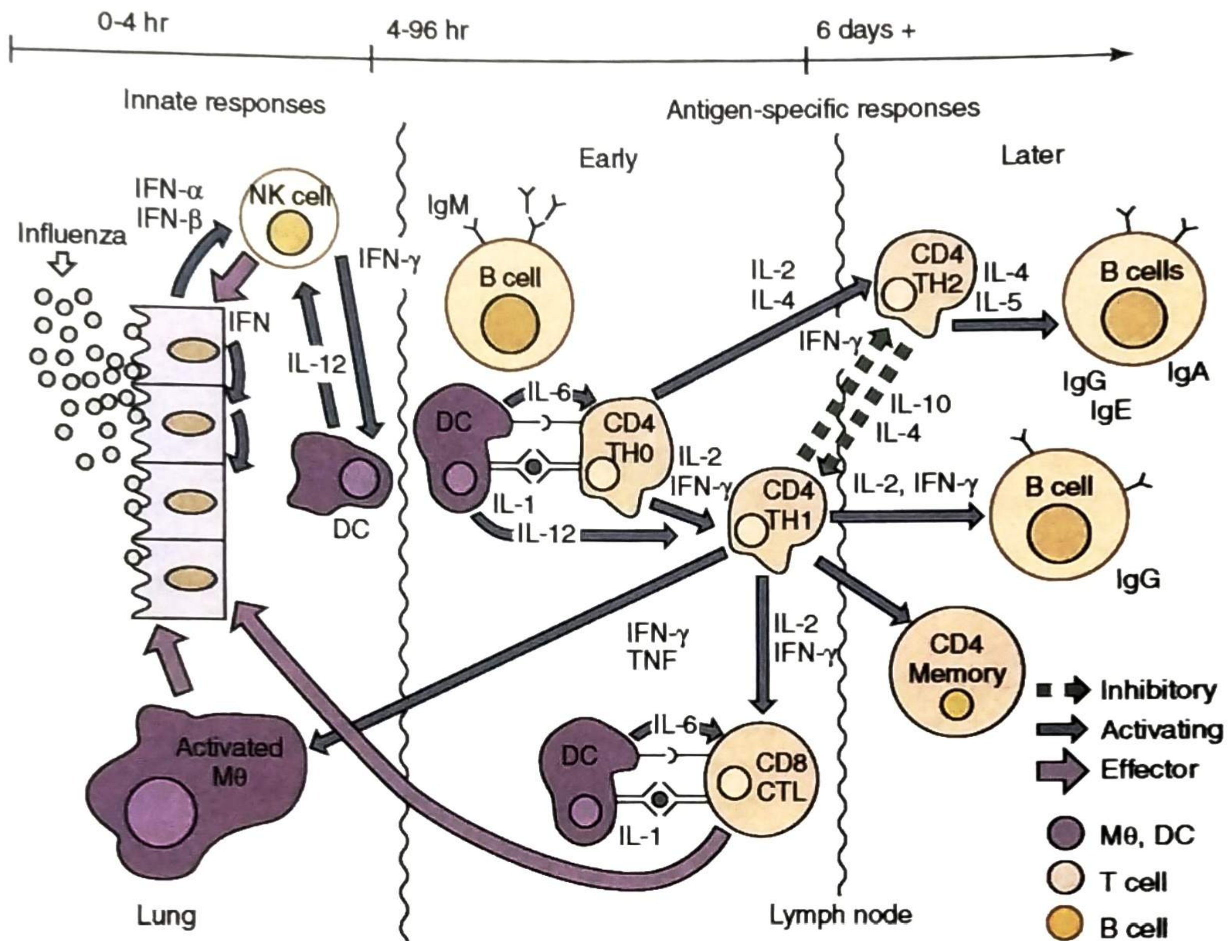
در پوست سلول‌های لانگ هانس سلول‌های دندرتیک نگهبان پاسخ‌دهنده به تروما و عفونت هستند. سلول‌های T یعنی CD4 و CD8 به صور ثابت به صورت چرخه‌ای از خون وارد پوست می‌شوند. در مجرای تنفسی پپتیدهای ضدمیکروبی و IgM ترشح شده باکتری‌های را کنترل می‌کند، آنها را در مخاط به دام انداخته و مژه‌ها مخاط و باکتری‌ها را به خارج از ریه‌ها منتقل می‌کنند. پاسخ‌های التهابی توسط ماکروفاژهای آلوئلار (ماکروفاژهای M2) کنترل می‌شوند تا از آسیب بافتی به فلور نرمال جلوگیری کنند. همانند مجرای معدی - روده‌ای، سلول‌های دندرتیک اپی‌تلیوم را برای میکروب‌های نرمال و غیرنرمال بررسی می‌کنند.

ایمونوپاتوژنز باکتریایی

فعال شدن پاسخ‌های التهابی و فاز حاد می‌تواند سبب آغاز آسیب عمده بافتی و سیستمیک گردد. فعال شدن ماکروفاژها و سلول‌های دندرتیک در کبد و طحال بوسیله اندوتوکسین می‌تواند سبب ترغیب آزاد شدن TNF-α به درون خون گردد که این موضوع موجب بروز بسیاری از علائم سپسیس شامل نقص همودینامیک، شوک و مرگ می‌شود (بخش طوفان سایتوکاینی و فصل ۱۱ را ببینید). اگرچه IL-6 ،IL-1 و TNF-α پاسخ‌های محافظتی علیه عفونت موضعی را ترغیب می‌نمایند این چنین پاسخ‌هایی هنگامی که توسط یک عفونت سیستمیک فعال شده باشند می‌توانند تهدید کننده حیات باشند. هنگامی که افزایش جریان خون و نشت مایعات در سراسر بدن رخ می‌دهد منجر به بروز شوک می‌شود. آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه آنتی‌ژن‌های باکتریایی که دارای شاخص‌های مشترک آنتی‌ژنی با پروتئین‌های انسانی می‌باشند می‌توانند سبب آغاز تخریب بافتی می‌گردد (مثلا آنتی‌بادی‌های تولید شونده در گلومرولونفریت و تب روماتیسمی استرپتوکوکوسی). فعال شدن غیر اختصاصی سلول‌های CD4T بوسیله سوپر آنتی‌ژن‌ها (مثلا توکسین سندروم شوک توکسیک ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس) تولید میزان فراوانی از سایتوکین‌ها را تحریک نموده و سرانجام مرگ تعداد زیادی از سلول‌های T را سبب می‌شوند. آزاد شدن ناگهانی میزان فراوانی از سایتوکین‌ها (طوفان سایتوکین "Cytokine Storm") می‌تواند سبب شوک و آسیب بافتی شدید گردد (مثلا سندروم شوک توکسیک) (قسمت طوفان سیتوکینی و فصل ۱۱ را مشاهده کنید).

فرار باکتری از پاسخ‌های ایمنی

مکانیسم‌هایی که توسط باکتری برای فرار از پاسخ‌های حفاظتی میزبان مورد استفاده قرار می‌گیرند در فصل ۱۱ بعنوان فاکتورهای ویرولانس شرح داده شده است. این مکانیسم‌ها شامل (۱) مهار فاگوسیتوز، مهار کشتار در درون سلول‌های فاگوسیت (۲) غیر فعال کردن عمکرد کمپلمان (۳) اتصال به بخش FC از IgG و شکستن IgA (۴) رشد داخل سلولی (فرار از آنتی‌بادی) و (۵) تغییر در نمایش آنتی‌ژنیک باکتریایی، می‌باشد. برخی از میکروارگانیسم‌ها که تنها به مایکوباکتریوم محدود نمی‌شوند (همچنین گونه‌های لیستریا و بروسلا) در درون ماکروفاژها زنده مانده و تکثیر می‌یابند و از ماکروفاژها به عنوان مخزن حفاظتی یا سیستم انتقال برای کمک به انتشار ارگانیسم‌ها در سراسر بدن استفاده می‌کنند. به هر حال ماکروفاژهای M1 فعال شده توسط سایتوکین می‌توانند پاتوژن‌های درون سلولی را بکشند.



شکل ۳-۷. پاسخ‌های ضد ویروسی. دوره زمانی از موضع (چپ) به سمت غده لنفاوی (راست) شروع شده و سپس به محل عفونت باز می‌گردد. پاسخ به ویروس (مثلا ویروس آنفلوآنزا) با تولید اینترفرون نوع یک و فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) آغاز می‌شود. سلول دندریتیک (DC) آغاز کننده سلول‌های CD4T و CD8 با فعال شدن ایمنی اختصاصی آنتی‌ژن مشابه به پاسخ ضدباکتریایی ادامه می‌یابد به استثناء اینکه لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک CD8 (CTLs) پاسخ‌های ضدویروسی مهمی هستند، IFN : اینترفرون، IL: اینترلوکین Mθ: ماکروفاژ، TH : سلول T کمکی، TNF: فاکتور نکروز دهنده توموری.

پاسخ‌های ضد ویروسی

دفاع‌های میزبان علیه عفونت ویروسی

پاسخ ایمنی بهترین و در بیشتر موارد تنها راه کنترل یک عفونت ویروسی است (شکل ۳-۷، کادر ۴-۷). متأسفانه منبع پاتوژنز برای بسیاری از بیماری‌های ویروسی است. پاسخ‌های ایمنی هomورال و سلولی برای ایمنی ضد ویروسی مهم می‌باشند. **هدف نهایی پاسخ ایمنی در یک عفونت ویروسی حذف ویروس و سلول‌های میزبان که به عنوان پناهگاه و محل تکثیر ویروس عمل می‌کنند، است. ناتوانی در حذف عفونت ممکن است منجر به عفونت پایدار یا عفونت مزمن و مرگ شود.**

دوره پاسخ ایمنی و طبیعت ایمونوپاتوژنز عفونت‌های باکتریایی و ویروسی متفاوت است. برای باکتری‌ها کمپلمان و فراخوانی نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها پاسخ آغازین هستند و آنها به سرعت التهاب مرتبط با بیماری را به راه می‌اندازند. آنتی‌بادی می‌تواند باکتری‌های خارج سلولی و توکسین‌های آنها را کنترل کنند.

اینترفرون‌ها، سلول‌های NK، پاسخ‌های CD4 TH1 و سلول‌های T کشنده CD8 سایتوتوکسیک در عفونت‌های ویروسی نسبت به عفونت‌های باکتریایی اهمیت بیشتری دارند. کمپلمان و نوتروفیل‌ها نقش محدودی در دفاع ویروسی دارد.

برای ویروس‌ها اینترفرون‌های تیپ I و سایتوکاین‌های

کادر ۳-۷: خلاصه‌ای از پاسخ‌های ضد ویروسی

اینترفرون
اینترفرون به وسیله RNA دو رشته‌ای القاء می‌شود، مانع از سنتز پروتئین سلولی یا تکثیر ویروس انولوپ‌دار می‌گردد.
اینترفرون، آغازگر وضعیت ضدویروسی در سلول‌های احاطه‌کننده است.
اینترفرون موجب مهار تکثیر موضعی ویروس می‌شود.
اینترفرون پاسخ‌های ضد ویروسی سیستمیک را فعال می‌کند.

سلول‌های کشنده طبیعی (NK)
به وسیله اینترفرون آلفا و اینترلوکین ۱۲ فعال می‌شوند، تولید اینترفرون گاما می‌کنند که ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک را فعال می‌کنند.
سلول‌های NK سلول‌های آلوده به ویروس را هدف قرار می‌دهند و آن‌ها را می‌کشند (خصوصا ویروس‌های انولوپ دار).

ماکروفاژ و سلول‌های دندریتیک
ماکرفاژها ذرات ویروسی را از خون پاکسازی می‌کنند.
ماکروفاژها ذرات ویروسی اپسونیزه را غیر فعال می‌کنند.
سلول‌های دندریتیک نابالغ (iDCS) موجب تولید IFN-α و سایر سایتوکین‌ها می‌شوند.
DC باعث شروع پاسخ سلول‌های T CD8 و TCD4 می‌شود.
DC و ماکروفاژها آنتی‌ژن را به سلول‌های TCD4 عرضه می‌کنند.

سلول‌های T
سلول‌های T برای کنترل عفونت‌های ویروسی غیر سایتولیتیک و انولوپ‌دار بکار می‌روند.
سلول‌های T پپتیدهای ویروسی عرضه شده توسط مولکول‌های کمپلکس سازگار نسجی (MHC) موجود بر روی سطوح سلولی را می‌شناسند.
پپتیدهای ویروسی آنتی‌ژنیک (اپی‌توپ‌های خطی) می‌تواند حاصل از هر پروتئین ویروسی (مانند گلیکو پروتئین‌ها، نوکلئو پروتئین‌ها) می‌باشند.
سلول‌های TCD8 سایتوتوکسیک به کمپلکس‌های پروتئین MHCI پپتید ویروسی بر روی سلول فعال پاسخ می‌دهند.
سلول‌های CD4T پاسخ‌های ضدویروسی را تحریک و تنظیم می‌کنند.

آنتی‌بادی
آنتی‌بادی ویروس خارج سلولی را خنثی می‌کنند.
آنتی‌بادی پروتئین‌های اتصالی ویروس (مانند گلیکوپروتئین‌ها، پروتئین‌های کپسیدی) را مهار می‌کند.
ساختار ویروس‌ها را ناپایدار می‌کند.
آنتی‌بادی باعث اپسونیزاسیون ویروس برای فاگوسیتوز می‌شود.
آنتی‌بادی باعث القای مرگ سلول هدف به وسیله آبشار کمپلمان و سایتوتوکسیته سلولی وابسته به آنتی‌بادی می‌شود.
آنتی‌بادی عفونت‌های ویروسی لیز کننده را رفع می‌کند.
آنتی‌بادی گسترش ویروسی به بافت هدف را مهار می‌کند.
وجود IgM نشان دهنده عفونت اخیر یا عود مجدد عفونت است.
IgG نسبت به IgM آنتی ویروس مؤثرتری است.
IgA ترشحی برای محافظت سطوح مخاطی مهم است.

بهبودی نیازمند از بین رفتن ویروس‌های آزاد (آنتی‌بادی) و سلول‌های تولیدکننده ویروس (از بین بردن به واسطه ایمنی سلولی است یا به وسیله ویروس).

DC: سلول، دندریتیک؛ IFN اینترفرون
Ig: ایمونوگلوبین؛ MHC، کمپلکس سازگاری نسجی اصلی؛ NK، سلول کشنده طبیعی، IL، اینترلوکین؛ RNA، ریبونوکلئیک اسید.

کادر ۴-۷. اینترفرون‌های نوع یک

تحریک
ریبونوکلئیک اسید دو رشته‌ای درطی تکثیر ویروس
مهار ویروسی سنتز پروتئین سلولی.
برهم‌کنش ویروس انولوپ دار با سلول دندریتیک پلاسما سایتوئید.

مکانیسم عمل
۱. سلول آلوده اولیه یا سلول دندریتیک پلاسما سایتوئید اینترفرون را آزاد می‌کنند.
۲. اینترفرون به گیرنده اختصاصی سطح سلول که بر روی سلول دیگر وجود دارد متصل می‌شود.
۳. اینترفرون وضعیت ضد ویروسی را القاء می‌کند.
سنتز پروتئین کیناز R (PKR)، ۲َ، ۵َ- الیگو آدنیلات سنتتاز و ریبونوکلئاز L.
۴. عفونت ویروسی سلول موجب فعال شدن این آنزیم‌ها می‌گردد.
۵. سنتز پروتئین مهار می‌شود تا تکثیر ویروسی مهارگردد.
تخریب mRNA (۲َ، ۵َ- الیگو آدنیلات سنتتاز و RNAsae (L)).
مهار گرد همایی ریبوزوم (PKR).
۶. شروع پاسخ ایمنی ذاتی و اختصاصی علیه ویروس.
تحریک ایجاد علایم شبه آنفلوآنزا

دیگر پاسخ را آغاز می‌کنند و سبب می‌شود علائم اولیه با ایمنی اختصاصی آنتی‌ژن، بیماری اختصاصی بافت و برطرف شدن عفونت ادامه یابد. درنتیجه دوره زمانی و طبیعت بیماری ویروسی و باکتریایی بسیار متفاوت هستند.

دفاع ذاتی

دفاع‌های ذاتی برای کنترل یک عفونت ویروسی کافی هستند و مانع بروز علائم می‌گردند. دمای بدن، تب، اینترفرون‌ها، سایر سایتوکین‌ها، سیستم فاگوسیتی تک هسته‌ای و سلول‌های NK نوعی پاسخ موضعی و سریع در برابر عفونت ویروسی ایجاد کرده و نیز موجب بروز دفاع ایمنی اختصاصی می‌شوند.

دمای بدن و تب می‌توانند تکثیر برخی ویروس‌ها را محدود کرده یا آنها را ناپایدار کنند. بسیاری از ویروس‌ها پایداری کمتری دارند (مانند ویروس هرپس سیمپلکس) یا نمی‌توانند در دمای ۳۷ درجه یا بالاتر رشد کنند (مانند رینوویروس). واکسن زنده آنفلوآنزا تخفیف حدت یافته است زیرا نمی‌تواند در بالای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تکثیر یابد.

جدول ۲-۷. ویژگی‌های اصلی اینترفرون‌های انسانی (IFNs)

ویژگی	IFN-α	IFN-β	IFN-γ
نامگذاری‌های قبلی	اینترفرون لوکوسیتی تیپ I	اینترفرون فیبروبلاستی تیپ I	اینترفرون ایمنی تیپ II
ژن‌ها	۲۰<	۱	۱
جرم ملکولی (Da) *	۱۶۰۰۰-۲۳۰۰۰	۲۳۰۰۰	۲۰۰۰۰-۲۵۰۰۰
پایداری در اسید	پایدار ‡	پایدار	حساس
فعال‌کننده اولیه	ویروس‌ها	ویروس‌ها	فعال‌سازی ایمنی
منبع اصلی	اپیتلیوم، لوکوسیت‌ها	فیبروبلاست	سلول T یا NK
هومولوژی با اینترفرون آلفا	۱۰۰٪	۳۰-۵۰٪	۱۰٪>

*جرم ملکولی فرم مونومریک.
‡ بیشتر ساب تیپ‌ها اما نه همه آن‌ها

عفونت ویروسی می‌تواند منجر به رهایی سایتوکاین‌ها (مانند TNF، IL-1) و اینترفرون از سلول‌های عفونی، سلول‌های دندریتیک نابالغ و ماکروفاژها شود. RNA ویروسی (مخصوصا RNA دو رشته‌ای)، DNA و برخی از گلیکوپروتئین‌های ویروسی فعال کننده‌های قوی TLRs متصل به غشاء می‌باشند و اسیدهای نوکلئیک ویروسی نیز می‌توانند گیرنده‌های الگوی پاتوژن سیتوپلاسمی را برای ایجاد اینترفرون و پاسخ‌های سایتوکین راه اندازند. این فاکتورهای پروتئینی محلول پاسخ‌های اولیه سیستمیک و موضعی را راه می‌اندازند. ایجاد تب و تخریب سیستم ایمنی دو اثر از اثرات سیستمیک می‌باشند.

سلول‌های **دندریتیک و سیستم فاگوسیتی** تک هسته‌ای ویروس و بقایای سلولی حاصل از سلول‌های عفونی شده با ویروس را فاگوسیت می‌کنند. ماکروفاژهای موجود در کبد (سلول‌های کوپفر) و طحال سریعاً بسیاری از ویروس‌ها را از خون پاک می‌کنند. آنتی‌بادی و کمپلمان با اتصال به ویروس برداشت آن را توسط ماکروفاژها آسان می‌کنند (اپسونیزاسیون). سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها نیز آنتی‌ژن را به سلول‌های T عرضه می‌کنند و منجر به آزاد شدن IL-1، IL-12 و IFN-α برای توسعه ایمنی ذاتی و شروع پاسخ‌های ایمنی اختصاصی آنتی‌ژن می‌گردند. سلول‌های دندریتیک پلاسما سایتوئید در خون تولید میزان زیادی IFN-α و سایر سایتوکاین‌ها در پاسخ به وجود ویروس در خون (ویرمی) می‌کنند.

سلول‌های NK توسط اینتروفرون‌های آلفا و بتا و IL-12 برای کشتن سلول‌های آلوده به ویروس فعال می‌شوند. عفونت ویروسی ممکن است بیان آنتی‌ژن‌های MHC را کاهش دهد یا اینکه باعث تغییراتی در کربوهیدرات‌های موجود بر روی پروتئین‌های سطحی شود تا سیگنال‌های سایتولیتیک را برای سلول‌های NK تولید نماید.

اینترفرون

اینترفرون (Interferon) اولین بار توسط Isaacs و Lindemann توصیف شد و بعنوان فاکتوری مطرح گردید که در تکثیر بسیاری از ویروس‌های مختلف تداخل می‌کند. اینترفرون اولین دفاع فعال بدن علیه عفونت ویروسی، یک سیستم اخطار اولیه در سطوح موضوعی و سیستمیک است. علاوه بر فعال‌سازی دفاع ضد ویروسی سلول هدف به منظور بلوکه کردن تکثیر ویروس، اینترفرون‌ها پاسخ ایمنی را فعال می‌کنند و شناسایی سلول عفونی را توسط سلول T افزایش می‌دهد. اینتروفرون دفاع بسیار مهمی علیه عفونت است اما همچنین عامل بروز علائم سیستمیک مرتبط با بسیاری از عفونت‌های ویروسی همچون بیقراری، خستگی، لرز و تب (علایم غیر اختصاصی شبه آنفولانزا) می‌باشد. اینترفرون تیپ یک فاکتوری است که سبب ایجاد لوپوس اریتماتوز سیستمیک نیز می‌شود.

IFNها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که براساس خصوصیات مختلفی شامل اندازه، پایداری، منشاء سلولی و طریقه عملکرد از یکدیگر متمایز می‌شوند (جدول ۲-۷). اینترفرون α(IFN-α) و اینترفرون β (IFN-β) اینترفرون‌های تیپ یک می‌باشد که در بسیاری از خصوصیات از جمله هومولوژی ساختاری و نحوه عملکرد

مشترک هستند. سلول‌های B، سلول‌های اپی تلیال، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک نابالغ اینترفرون آلفا (IFN-α) می‌سازند. سلول‌های دندریتیک پلاسما سایتوئید در خون، در پاسخ به ویرمی، میزان زیادی اینترفرون آلفا تولید می‌کنند. فیبروبلاست‌ها و سایر سلول‌ها در پاسخ به عفونت ویروسی و سایر ترکیبات، اینترفرون بتا (IFN-β) تولید می‌کنند. اینترفرون لامبدا [IFN-λ] یک اینترفرون تیپ ۳ است که دارای فعالیتی شبیه به اینترفرون آلفا می‌باشد و جهت پاسخ‌های ضد آنفلوآنزا مهم است. اینترفرون گاما (IFN-γ) اینترفرون تیپ ۲ می‌باشد و سایتوکاینی است که توسط سلول‌های NK و T فعال شده در مراحل بعدی عفونت ساخته می‌شود. گرچه IFN-γ مانع تکثیر ویروس می‌شود اما ساختمان و نحوه عملکرد آن با سایر اینترفرون‌ها متفاوت است. IFN-γ همچنین به عنوان **فاکتور فعال کننده ماکروفاژ** شناخته شده است و جزئی از پاسخ TH1 تعریف می‌شود.

بهترین محرک تولید IFN-α و IFN-β، RNA دو رشته‌ای (ds RNA) است که به عنوان واسطه‌های تکثیری RNA ویروس‌ها یا از واکنش RNAs پیامبر (mRNAs) سنس و آنتی سنس برای برخی از DNA ویروس‌ها تولید می‌شود (کادر ۵-۷). یک مولکول dsRNA در هر سلول برای تحریک تولید اینترفرون کافی است. واکنش برخی از ویروس‌های انولوپ دار (مثلا هرپس سیمپلکس ویروس و ویروس نقص ایمنی انسان (HIV)) با سلول‌های دندریتیک پلاسما سایتوئید منجر به تولید IFN-α می‌شود. در مسیری دیگر، مهار سنتز پروتئین در سلول آلوده به ویروس می‌تواند تولید پروتئین مهار کننده ژن اینترفرون را کاهش دهد و اجازه می‌دهد ژن اینترفرون بیان شود. محرک‌های غیر ویروسی اینترفرون شامل:

(۱) میکروارگانیسم‌های درون سلولی (مانند مایکوباکتریوم‌ها، قارچ‌ها و پرتوزوآها).

(۲) فعال کننده‌های TLRs یا میتوژن‌های معین (مانند اندوتوکسین‌ها، فیتوهماگلوتینین).

(۳) پلی نوکلئوتیدهای دو رشته‌ای (مانند پلی I:C، پلی dA:dT).

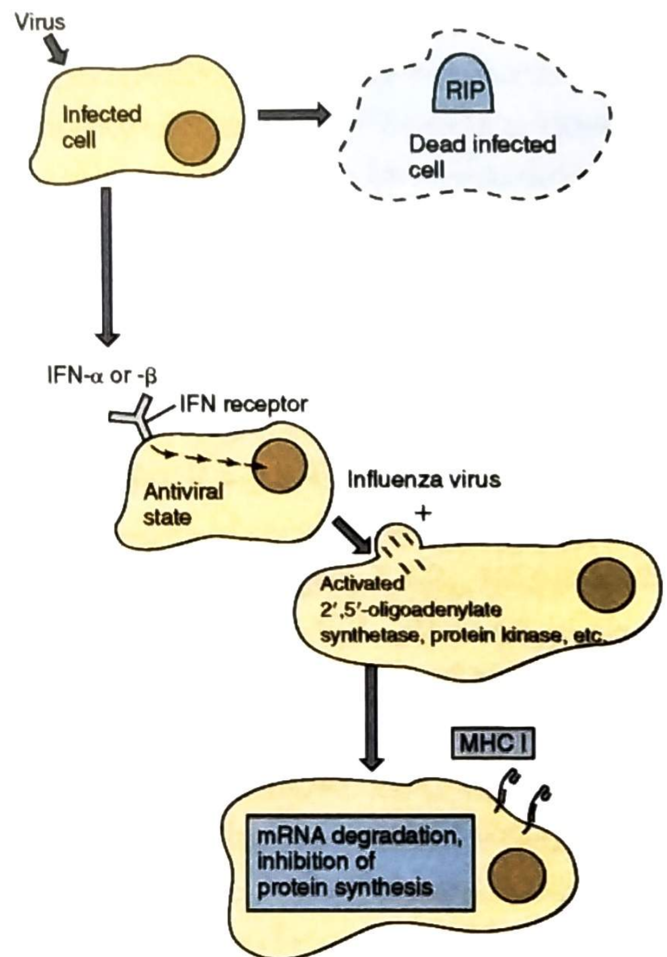
(۴) پلیمرهای پلی آنیون مصنوعی (مانند: پلی سولفات‌ها، فسفات‌ها و پیران (Pyran)).

(۵) آنتی بیوتیک‌ها (مانند کانامایسین، سیکلوهگزامید).

(۶) ترکیبات مصنوعی با وزن مولکولی پایین (مانند تیلورون (Tilorone)، رنگ‌های آکریدین).

اینترفرون به گیرنده‌های اختصاصی بر روی سلول‌های مجاور متصل شده و منجر به تحریک تولید پروتئین‌های ضد ویروسی می‌شود (وضعیت ضد ویروسی (**The Antiviral State**)). به هر حال، این پروتئین‌های ضد ویروسی غیر فعال هستند تا اینکه آن‌ها به dsRNA متصل شوند. اثرات بزرگ ضد ویروسی اینترفرون توسط دو آنزیم ۲´،۵´ -**اولیگوآدنیلات سنتتاز** (2´,5´-oligoadenylate Synthetase) (یک پلیمراز غیر معمول) و پروتئین کیناز R (**Protein Kinase R (PKR)**) (شکل ۵-۷) تولید می‌شود و برای آنفولانزا **پروتئین mx** (mx Protein) نیز ضروری می‌باشد. عفونت ویروسی سلول و تولید dsRNA موجب فعال شدن آنزیم‌ها می‌گردد و آبشاری از وقایع بیوشیمیایی به راه می‌افتد که منجر به (۱) مهار سنتز پروتئین به وسیله فسفوریلاسیون PKR، یک فاکتور آغازگر ریبوزومی (فاکتور شروع کننده طویل‌سازی آلفا دو (eIF-2α)) و (۲) تجزیه mRNA (ترجیحاً mRNA ویروسی) توسط ریبونوکلئاز L که توسط ۲´،۵´ - اولیگو آدنوزین فعال می‌شود. PKR و ریبونوکلئاز L به ترتیب به RNA دورشته‌ای و ۲´،۵´- اولیگوآدنوزین متصل می‌شوند، همانند دانه‌های روی یک زنجیر، و سپس هر یک به دیگری متصل می‌شوند تا تشکیل مولتی‌مرها را داده و فعال شوند. این روند بر روی کارخانه سنتز پروتئین سلولی اثر کرده و از همانندسازی ویروس جلوگیری می‌کند. باید تأکید کرد که اینترفرون نمی‌تواند مستقیماً تکثیر ویروسی را مهار کند. حالت ضد ویروسی ۲ تا ۳ روز طول می‌کشد که این مدت ممکن است برای تخریب ویروس توسط سلول بدون این که سلول کشته شود، کافی باشد. بسیاری از ویروس‌ها دارای مکانیسم‌هایی برای فرار از پاسخ اینترفرون یا مهار آن هستند.

اینترفرون‌ها ایمنی سلولی را با فعال کردن سلول‌های مؤثر تحریک می‌کنند و توانایی شناسایی سلول هدف آلوده به ویروس را افزایش می‌دهند. اینترفرون‌های تیپ یک سلول‌های NK را فعال می‌کنند و در فعال‌سازی سلول‌های CD8T همکاری می‌نمایند. اینترفرون و *سلول‌های NK فعال شده یک دفاع اولیه، موضعی و طبیعی را علیه عفونت*

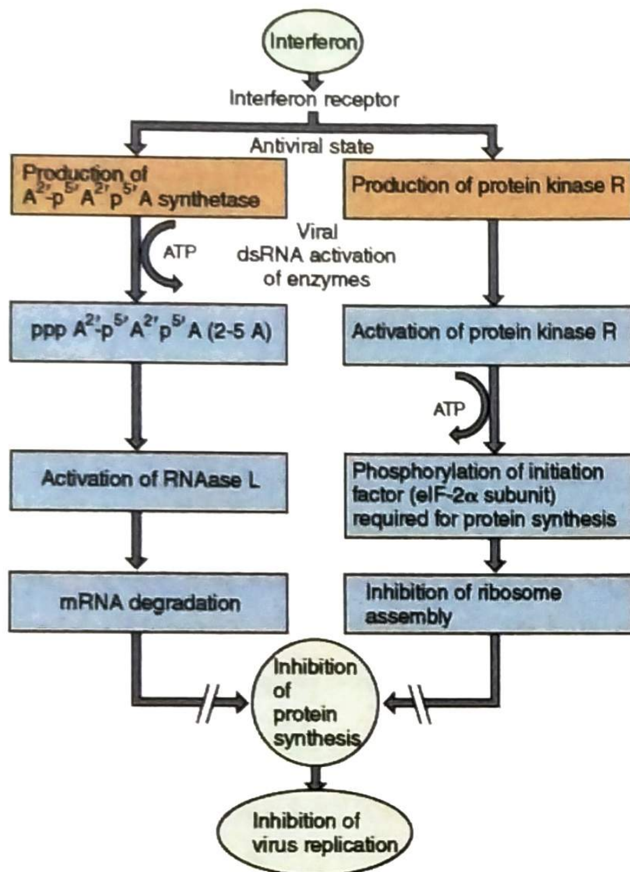


شکل ۴-۷. القای وضعیت ضد ویروسی به وسیله اینترفرون آلفا و اینترفرون بتا، اینترفرون در پاسخ ضد ویروسی تولید می‌شود اما نمی‌تواند سلول آلوده را تحت تأثیر قرار دهد. اینترفرون به گیرنده سطح سلول که بر روی سایر سلول‌ها قرار دارد می‌چسبد و تولید آنزیم‌های ضد ویروسی را القاء می‌کند (حالت ضد ویروسی). عفونت و تولید RNA دو رشته‌ای موجب فعال شدن فعالیت ضد ویروسی می‌گردد. MHC I: آنتی‌ژن سازگار سنجی اصلی نوع I.

ویروسی ایجاد می‌کنند. IFN-α و IFN-β بیان آنتی‌ژن‌های MHC-I را افزایش می‌دهند و توانایی سلول را برای ارائه دادن آنتی‌ژن بالا می‌برند و سلول را هدف بهتری برای سلول‌های T سیتوتوکسیک (CTLs) قرار می‌دهند.

فعال شدن ماکروفاژها توسط IFN-γ موجب افزایش IFN-α و IFN-β ترشحی از دیگر تعدیل کننده‌های پاسخ بیولوژیکی، فاگوسیتوز، عود و پاسخ‌های التهابی می‌گردد. IFN-γ موجب افزایش بیان آنتی‌ژن‌های MHC-II روی ماکروفاژ می‌شود تا به تقویت عرضه آنتی‌ژن به سلول‌های T کمک کند.

اینترفرون همچنین دارای اثرات تنظیمی وسیعی روی



شکل ۵-۷. دو روش اصلی برای ممانعت از سنتز پروتئین ویروسی توسط اینترفرون. یکی از مکانیسم‌ها، القاء نوعی پلیمراز غیر معمول (´۲-´۵- الگیو آدنیلات سنتتاز [2-5A]) است که در اثر RNA دو رشته‌ای (dsRNA) فعال می‌شود. آنزیم فعال شده یک آدنین غیر معمول را با یک اتصال ´۲-´۵ فسفودی استرازی سنتز می‌کند. الیگومر RNase L را فعال می‌کند که RNA پیامبر mRNA را تجزیه می‌کند. مکانیسم دیگر شامل القاء پروتئین کیناز PKR) R) است که به وسیله فسفریلاسیون فاکتور آغازگر طویل سازی (eIF–2α) از تجمع ریبوزوم و در نتیجه شروع سنتز پروتئین جلوگیری می‌کند. ATP: آدنوزین تری فسفات.

رشد سلول، سنتز پروتئین و پاسخ ایمنی است. هر سه تیپ اینترفرون موجب مهار تکثیر سلولی در دوزهای مناسب می‌شوند.

اینترفرون نوترکیب مهندسی شده ژنتیکی بعنوان یک درمان ضد ویروسی برای برخی از عفونت‌های ویروسی مورد استفاده قرار می‌گیرد (مانند ویروس‌های پاپیلومای انسانی، هپاتیت C). درمان مؤثر نیاز به استفاده صحیح از ساب تیپ‌های اینترفرون و تحویل سریع در غلظت مناسب می‌باشد. استفاده از اینترفرون β برای درمان مولتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis) براساس پیشگیری از عرضه پروتئین پایه میلین به سلول‌های دندریتیک (DCs)

استفاده می‌شود. اینترفرون‌ها همچنین بصورت آزمایشی برای درمان سرطان‌های خاص به کار می‌روند. به هر حال، *درمان با اینترفرون اثرات جانبی شبه آنفولانزایی همچون لرز، تب و خستگی دارد.*

ایمنی اختصاصی آنتی‌ژن

هدف ایمنی اختصاصی آنتی‌ژن حذف ویروس‌های آزاد و سلول‌های تولیدکننده ویروس است، اما گاهی اوقات تنها می‌تواند عفونت مزمن را کنترل کند. ایمنی هومورال و ایمنی سلولی نقش‌های متفاوتی در پاکسازی عفونت‌های ویروسی (یعنی ریشه کنی ویروس از بدن) بازی می‌کنند. ایمنی هومورال (آنتی‌بادی) عمدتاً روی ویروس‌های خارج سلولی نقش مهمی را ایفا می‌کند در حالی که ایمنی به واسطه سلول (سلول‌های T) به طور مستقیم به سلول تولید کننده ویروس حمله می‌کند.

ایمنی هومورال

تمامی پروتئین‌های ویروسی عملاً برای سلول میزبان بیگانه بوده و ایمونوژن می‌باشند (یعنی قادر به تحریک پاسخ آنتی‌بادی هستند). به هر حال، همه ایمونوژن‌ها موجب ایمنی حفاظتی نمی‌شوند.

آنتی‌بادی پیش روی بیماری را از طریق **خنثی سازی و اپسونیزاسیون** ویروس آزاد از سلول مهار می‌کند. پاسخ‌های محافظتی آنتی‌بادی نسبت به پروتئین‌های کپسید ویروسی ویروس‌های برهنه و گلیکوپروتئین‌های ویروس‌های پوشش‌دار که با گیرندهای سطح سلول (پروتئین‌های اتصالی ویروس) واکنش می‌دهند، تولید می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند ویروس‌ها را به وسیله جلوگیری از واکنش آن‌ها با سلول‌های هدف یا ناپایدار کردن آن‌ها و سپس تجزیه و متلاشی کردن آن‌ها خنثی کنند. آنتی‌بادی با اتصال به ویروس آن را اپسونیزه کرده و موجب افزایش برداشت و پاکسازی آن توسط ماکروفاژ می‌شود. آنتی‌بادی با شناسایی سلول‌های آلوده می‌تواند سایتوتوکسیتی سلولی وابسته به آنتی‌بادی (ADCC) را به وسیله سلول‌های NK تحریک کند. آنتی‌بادی علیه دیگر آنتی‌ژن‌های ویروسی ممکن است جهت آنالیز سرولوژیکی عفونت ویروسی مفید باشد.

مهم‌ترین نقش ضد ویروسی آنتی‌بادی جلوگیری از انتشار ویروس‌های خارج سلولی به سلول‌های دیگر است. آنتی‌بادی به ویژه در محدود کردن انتشار ویروس در نتیجه ورود ویروس به خون **(Viremia)** و جلوگیری از رسیدن ویروس به بافت هدف به منظور ایجاد بیماری دارای اهمیت است. آنتی‌بادی بیشترین تأثیر را در پاک سازی عفونت‌های سایتولتیک دارد. *به دلیل اینکه ویروس در کارخانه سلول کشته می‌شود و آنتی‌بادی ویروس خارج سلولی را ریشه کن می‌کند پاکسازی اتفاق می‌افتد.*

ایمنی ناشی از سلول T

ایمنی سلولی موجب تولید آنتی بادی می‌شود و پاسخ‌های التهابی (سلول‌های T کمکی CD4) را تحریک می‌نماید و سلول‌های آلوده را می‌کشد (سلول‌های T سیتوتوکسیک [عمدتا سلول‌های CD8]). پاسخ **CD4 TH1** معمولاً مهمتر از پاسخ‌های TH2 در کنترل عفونت ویروسی مخصوصاً ویروس‌های پوشش‌دار و غیر سیتولیتیک می‌باشد. سلول‌های T کشنده CD8 همچنین می‌توانند آپوپتوز سلول‌هایی که پپتیدهای ویروسی‌شان توسط پروتئین MHC کلاس I به رسپتور سلول T عرضه شده را تحریک نمایند. پپتیدهایی که روی MHC کلاس I بیان می‌شوند همان آنتی‌ژن‌هایی هستند که از سنتز پروتئین‌های ویروسی در داخل سلول عفونی (مسیر اندوژن) بدست آمده‌اند. پروتئین‌های ویروسی که این پپتیدها از آن مشتق شده‌اند (مثلا پروتئین‌های ویروسی داخل سلولی و بین سلولی، پروتئین‌های هسته‌ای، پروتئین‌های با پردازش یا تاخوردگی نامناسب [آشغال سلولی]) ممکن است تولید آنتی‌بادی حفاظتی را سبب نشوند. برای مثال پروتئین‌های ماتریکس و نوکلئوپروتئین‌های ویروس آنفولانزا و پروتئین (هسته‌ای) ICP4 هرپس سیمپلکس ویروس همه اهدافی برای لیز توسط CTLها محسوب می‌شوند اما نمی‌توانند آنتی‌بادی‌های حفاظتی را تحریک کنند. یک **سیناپس ایمنی (Immune synaps)** به وسیله واکنش TCR با MHC کلاس I، رسپتورهای کمکی و مولکول‌های چسبیده تشکیل می‌شود و **پرفورین (Perforin)** قالبی شبیه به منفذ غشایی که کمپلمان ایجاد می‌کند تشکیل می‌دهد و گرانزیم‌ها (Granzymes) (آنزیم‌های تجزیه کننده) به درون این فضای بین CTL و سلول هدف آزاد می‌شود و منجر به

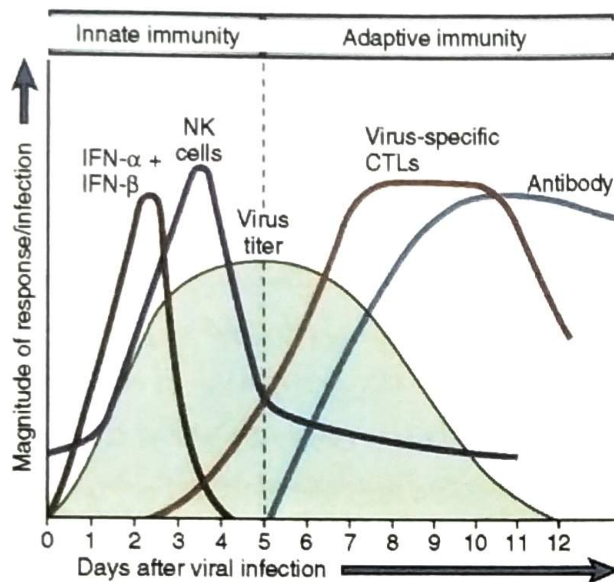
آپوپتوز در سلول هدف می‌گردد. واکنش بین پروتئین Fas لیگاند موجود بر روی T سل‌های CD4 یا CD8 با پروتئین Fas موجود بر روی سلول هدف نیز می‌تواند سبب تحریک آپوپتوز شود. *CTLs، سلول‌های آلوده را از بین می‌برد و در نتیجه منبع ویروس جدید را حذف می‌کند.*

پاسخ CD8 سلول T احتمالاً به عنوان یک دفاع ضد عفونت ویروسی تکامل یافته است. ایمنی سلولی به ویژه در حذف عفونت‌های ناشی از ویروس‌های ایجاد کننده سین‌سی‌شیوم (Syncytia-forming Viruses) (مانند ویروس‌های سرخک، هرپس سیمپلکس، واریسلا زوستر و HIV) نقش دارد چرا که این ویروس بدون آنکه با آنتی‌بادی برخورد نماید از سلولی به سلول دیگر انتشار می‌یابند، همچنین این ایمنی در حذف ویروس‌های غیر سایتولتیک (مانند ویروس‌های هپاتیت A و ویروس سرخک) نقش دارد. TCD8 سلول‌های T در تعامل با نورون‌ها، ویروس‌های نهفته (هرپس سیمپلکس ویروس، ویروس واریسلازوستر، پاپیلوما ویروس و JC) را بدون اینکه بکشند، کنترل می‌کنند.

پاسخ ایمنی در برابر درگیری ویروسی

درگیری اولیه ویروسی

پاسخ‌های ایمنی ذاتی ابتدایی‌ترین پاسخ در برابر درگیری ویروسی است و اغلب برای جلوگیری از گسترش ویروس کافی می‌باشد (شکل ۳-۷ و نیز شکل ۶-۷ را ببینید). **اینترفرون نوع یک** در پاسخ به اکثر عفونت‌های ویروسی برای حفاظت از سلول‌های مجاور ایجاد می‌شود و موجب افزایش بیان MHC بر روی سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن و حذف سلول‌های عفونی توسط فعال کردن سلول‌های NK و پاسخ‌های اختصاصی آنتی‌ژن می‌شود. ویروس و ترکیبات ویروسی آزاد شده از سلول‌های عفونی به وسیله سلول‌های دندریتیک نابالغ فعال فاگوسیت شده و این سلول‌ها تولید سایتوکین می‌کنند و سپس به سمت غدد لنفاوی حرکت می‌نمایند. ماکروفاژهای موجود در کبد و طحال دارای اهمیت ویژه‌ای در حذف ویروس از جریان خون می‌باشند (فیلترها). این سلول‌های فاگوسیتی آنتی‌ژن‌های ویروسی را تجزیه و پردازش می‌کنند. سلول‌های دندریتیک قطعات پپتیدی مناسب را برای عرضه



شکل ۶-۷. دوره زمانی پاسخ‌های ایمنی ضدویروسی. CTL، لنفوسیت T سایتوتوکسیک؛ IFN-γ، اینترفرون گاما.

به سلول‌های TCD4 به MHC کلاس II می‌چسبانند و همچنین می‌توانند سبب عرضه متقاطع این آنتی‌ژن‌ها بر روی مولکول‌های MHC کلاس I به سلول‌های CD8 T برای شروع پاسخ شوند. APCها همچنین می‌توانند IL-1، IL-6 و IFN-α را آزاد کنند و سبب ایجاد تب شوند و یا با تولید IL-12 سبب فعال شدن سلول‌های T کمکی و تولید سایتو کاین اختصاصی (پاسخ TH1) شوند. اینترفرون نوع یک و این سایتوکین‌ها سبب تحریک علائم شبه آنفلوآنزا اولیه بسیاری از عفونت‌های ویروسی می‌شوند. سلول‌های T فعال شده به طرف جایگاه عفونت و مناطق B-Cell غده لنفاوی حرکت می‌کنند و ماکروفاژها و سلول‌های B آنتی‌ژن را عرضه می‌کنند و به وسیله سلول‌های T تحریک می‌شوند.

پاسخ‌های ایمنی ضدویروسی نیاز به حداقل ۸ روز دارند تا پس از اینکه ویروس وقت انتشار داشته باشد، گسترش یابند. سلول‌های CD4 T و CD8. ۷ تا ۱۰ روز پس از عفونت وجود دارند که تقریباً شبیه زمان IgG سرم است. در طول عفونت تعداد سلول‌های TCD8 اختصاصی برای آنتی‌ژن ممکن است تا ۱۰۰۰۰۰ برابر افزایش یابند. سلول‌های TCD8 اختصاصی برای آنتی‌ژن به سمت محل عفونت حرکت کرده و سلول‌های آلوده به ویروس را از بین می‌برند. شناسایی و اتصال به سلول‌های هدف عرضه کننده پپتید ویروسی همراه با MHC کلاس I موجب تحریک آپوپتوزیس و کشتار

سلول‌های هدف می‌گردد که این عمل از طریق آزادسازی پرفورین و گرآنزیم (برای تخریب غشاء سلولی) و یا از راه اتصال به لیگاند Fas به Fas بر روی سلول هدف انجام می‌شود. IgG و IgA پس از ۷ تا ۱۰ روز تولید می‌شوند. IgA ترشحی در پاسخ به درگیری ویروسی در سطوح مخاطی نواحی باز بدن (مانند چشم‌ها، دهان و سیستم‌های مجاری تنفسی و گوارشی) تولید می‌شود. پاکسازی عفونت در مرحله بعد رخ می‌دهد، زمانی که آنتی‌بادی کافی برای خنثی‌سازی تمام دودمان ویروس وجود داشته باشد یا زمانی که ایمنی سلولی قادر باشد به سلول‌های عفونی برسد و آن‌ها را حذف کند. *برای پاکسازی اکثر عفونت‌های ویروسی غیر سایتولیتیک و پیشرفته، علاوه بر آنتی‌بادی خنثی‌کننده ویروس آزاد* پاسخ‌های وابسته به TH1 برای کشتن کارخانه ویروسی عفونت لازم هستند.

عفونت‌های ویروسی مغز و چشم می‌توانند موجب صدمه شدیدی شوند زیرا این بافت‌ها نمی‌توانند آسیب بافتی را ترمیم کنند و **جایگاه‌های خاص ایمونولوژیکی** بدن هستند. پاسخ‌های سلول T برای جلوگیری از تخریب شدید بافتی مهار می‌شوند که همراه با التهاب است. پاسخ‌های TH17 و نوتروفیل‌های اختصاصی علیه ویروس هرپس سیمپلکس و سایر عفونت‌های ویروسی چشم آغاز می‌شوند.

برای بسیاری از عفونت‌های ویروسی قبل از اینکه پاسخ‌های آنتی‌بادی و سلول T ایجاد شوند عفونت ویروس گسترش می‌یابد، در تمام بدن منتشر شده و بافت هدف (مثلاً مغز، آنسفالیت؛ کبد، هپاتیت) را عفونی می‌کند. در نتیجه پاکسازی عفونت گسترش یافته نیاز به پاسخ ایمنی بزرگتر و قوی می‌باشد که اغلب شامل ایمونوپاتوژنز و آسیب بافتی بوده و سبب ایجاد علائم بیماری می‌گردد.

درگیری ثانویه ویروسی

در هر جنگی در صورتی که هویت و منشاء دشمن مشخص باشد و اگر از تثبیت جای پای آن بتوان جلوگیری کرد از بین بردن آن آسان‌تر است. به طور مشابهی در بدن انسان ایمنی اولیه که توسط عفونت قبلی یا واکسیناسیون به وجود می‌آید، باعث هدایت سریع و اختصاصی ایمنی برای جلوگیری از علائم بیماری، تقویت پاکسازی سریع ویروس و مهار گسترش خونی ویروس از جایگاه اولیه عفونت به بافت هدف برای جلوگیری از عفونت می‌شود. به همین دلیل اکثر درگیری‌های ویروسی ثانویه بدون علامت هستند. آنتی‌بادی و سلول‌های B و T خاطره‌ای در ایمنی میزبان حضور دارند تا ایجاد یک پاسخ تقویتی (Booster) وسیع و سریع در برابر ویروس نمایند. IgA سریعاً تولید می‌شود تا یک دفاع مهم در برابر عفونت مجدد از طریق نواحی طبیعی باز بدن ایجاد نماید اما فقط بصورت گذرا تولید می‌گردد.

نتیجه پاسخ ایمنی در برابر عفونت ویروسی توسط میزبان، ویروس و فاکتورهای دیگر تعیین می‌شود. فاکتورهای میزبان شامل زمینه ژنتیکی، سطح ایمنی، سن و سلامت عمومی فرد می‌باشند. فاکتورهای ویروسی شامل سویه ویروسی، دوز عفونت و راه ورود ویروس می‌باشد. زمان مورد نیاز برای ایمنی حفاظتی اولیه، گسترش پاسخ، میزان کنترل عفونت، پتانسیل ایمونوپاتولوژی (فصل ۳۷ را ببینید) در نتیجه عفونت پس از عفونت اولیه و درگیری مجدد با یکدیگر فرق دارد.

مکانیسم‌های ویروسی جهت فرار از پاسخ ایمنی

فاکتور اصلی در بیماریزایی ویروس توانایی فرار از پاکسازی سیستم ایمنی می‌باشد. ویروس‌ها ممکن است با فرار از شناسایی، جلوگیری از فعال شدن یا مهار ارسال پاسخ ایمنی از پاکسازی توسط سیستم ایمنی فرار کنند. مثال‌های اختصاصی در جدول ۳-۷ آمده است. برخی از ویروس‌ها حتی پروتئین‌های خاصی را کد می‌کنند که سبب مهار پاسخ ایمنی می‌شوند.

ایمونوپاتوژنز ویروس

علائم بسیاری از بیماری‌های ویروسی نتیجه فعالیت سایتوکاین یا پاسخ‌های ایمنی بیش از حد می‌باشد. علائم شبه سرماخوردگی آنفولانزا و بسیاری از ویروس‌ها که باعث ایجاد ویرمی (Viremia) می‌شوند (مانند آربوویروس‌ها) ناشی از اینترفرون‌ها و دیگر پاسخ‌های سایتوکینی تحریک شده توسط ویروس می‌باشد. آنتی‌بادی با میزان زیادی از آنتی‌ژن‌های ویروسی در خون واکنش می‌دهد مانند آنچه که در عفونت هپاتیت B رخ می‌دهد و می‌تواند منجر به بیماری‌های کمپلکس ایمنی شود. راش سرخک، آسیب شدید بافتی به مغز در ارتباط با آنسفالیت (*itis* به معنی

جدول ۳-۷. مثال‌هایی از فرار ویروسی از پاسخ‌های ایمنی

مکانیسم	مثال‌های ویروسی	عملکرد
پاسخ هومورال		
مخفی شدن از آنتی‌بادی	هرپس ویروس‌ها، رترو ویروس‌ها	عفونت نهفته
	هرپس سیمپلکس ویروس، ویروس واریسلا زوستر، پارامیکسوویروس‌ها، ویروس‌های نقص ایمنی انسانی	عفونت سلول به سلول (تشکیل سنسشیوم)
تغییر آ نتی ژنی	لنتی ویروس‌ها (ویروس نقص ایمنی انسانی)	تغییر ژنتیکی پس از عفونت
	ویروس آنفولانزا	تغییرات آنتی‌ژنی سالیانه (دریفت)، تغییرات پاندمیک (شیفت)
ترشح آنتی‌ژن مهار کننده	ویروس هپاتیت B	آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B
اینترفرون		
مهار تولید	ویروس هپاتیت B	ممانعت از رونویسی اینترفرون
	ویروس اپشتاین بار	آنالوگ IL-10 (BCRF-1) تولید IFN-γ را مهار می‌نماید.
مهار عملکرد	آدنوویروس	مهار فرا تنظیم بیان MHC، VA1 منجر به مهار فعال شدن پروتئین کیناز القاء شده توسط اینترفرون (PKR) به وسیله RNA دو رشته‌ای می‌شود.
	ویروس هرپس کمپلکس	غیر فعال کردن PKR و فعال کردن فسفاتاز (PP1) برای فعال شدن معکوس فاکتور شروع کننده برای سنتز پروتئین
عملکرد سلول ایمنی		
نقص عملکرد دندریتیک سل (DC)	سرخک و هپاتیت C	تحریک IFN-β که عملکرد سلول دندریتیک را مهار می‌کند.
نقص عملکرد لنفوسیت	ویروس هرپس سیمپلکس	جلوگیری از کشتار T سل CD8
	ویروس نقص ایمنی انسان	کشتن T سل‌های CD4 و تغییر ماکروفاژها
	ویروس سرخک	مهار سلول‌های NK، T و B
فاکتورهای سرکوب کننده ایمنی	ویروس اپشتین بار	BCRF-1 (مشابه IL-10) موجب مهار پاسخ‌های سلول‌های T کمکی CD4 TH1 می‌شود.
کاهش عرضه آنتی‌ژن		
کاهش بیان MHC کلاس I	آدنوویروس ۱۲	مهار رونویسی MHC کلاس I پروتئین 19KDa (ژن E3) به زنجیره سنگین MHC کلاس I متصل شده و مانع از جابجایی آن به سطوح سلول می‌شود.
	سایتومگالوویروس	پروتئین H30l موجب مهار بیان سطحی β2-میکروگلوبولین و مولکول‌های MHC کلاس I می‌گردد.
	ویروس هرپس سیسمپلکس	ICP47 با مهار TAP، باعث ممانعت از ورود پپتید به ER و اتصال به مولکول‌های MHC کلاس I می‌گردد.
ممانعت از التهاب		
	پاکس ویروس، آدنوویروس	مهار عملکرد IL-1 یا فاکتور نکروز دهنده تومور

DC: سلول‌های دندریتیک، ER: شبکه اندوپلاسمی، ICP47: پروتئین سلول عفونی شده ۴۷، IFN : اینترفرون، IL: اینترلوکین، KDa: کیلودالتون، MHC I: کمپلکس سازگاری سنجی تیپ I ، NK: کشنده طبیعی، PKR: پروتئین کیناز، PMN: نوتروفیل‌های چند هسته‌ای، TAP: انتقال دهنده مرتبط با تولید آنتی‌ژن.

کادر ۵–۷ . خلاصه‌ای از پاسخ‌های ضدقارچی

پپتیدهای ضد میکروبی تولیدشـده سلول‌های اپی‌تلیال، نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و سایر سلول‌ها دفاع اصلی هستند. نوتروفیل‌ها بسـیار مهم هسـتند. آنها گونه‌های اکسـیژن واکنشـی و ترکیبـات ضدقارچی آزاد می‌کننـد و قارچ‌ها را فاگوسیت می‌کنند.

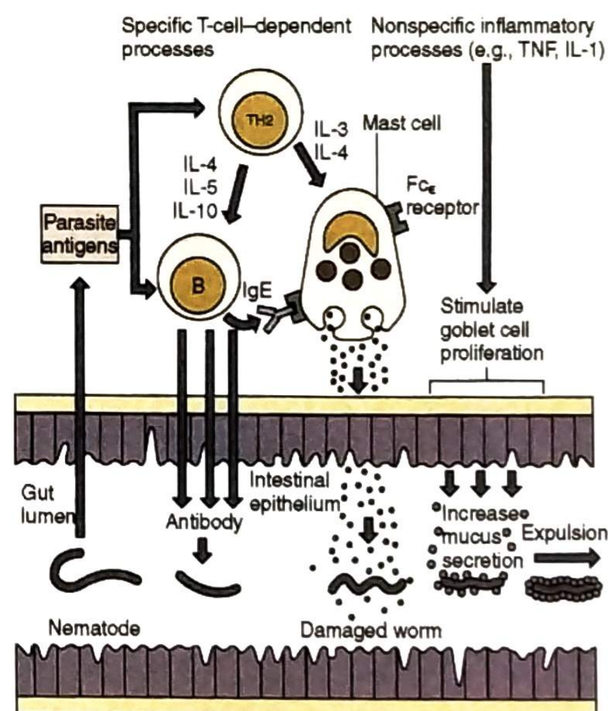
ماکروفاژها نیز مهم هستند.

پاسـخ‌های TH17 عملکرد ضدقارچی نوتروفیل‌ها و سلول اپی‌تلیال و تولید پپتیـد ضدمیکروبی را مجدداً فعال می‌کنند اما التهاب را تقویت می‌نمایند.

پاسـخ‌های **TH1** عملکردهـای ماکروفاژ را مجـدداً فعال می‌نماینـد اما التهاب را تقویت می‌کنند. تشـکیل گرانولوما برای عفونت‌های درون سلولی (هیستوپلاسما) مهم است.

پاسـخ‌های **TH2** یعنی از طریـق G(Ig) و IgA می‌تواند اتصـال قارچ‌ها و فعالیت توکسـین را بلوکـه کنند اما IgE می‌تواند آلرژی و آسم را تقویت کند.

التهاب می‌باشد) هرپس سیمپلکس ویروس و آسیب بافتی و علائم ناشـی از هپاتیت بدلیل پاسـخ‌های ایمنی سلولی است. پاسخ‌های تهاجمی‌تر سـلول NK و سلول T بالغین سبب برانگیختن برخی از بیماری‌هایی که در دروان کودکی ملایم بوده‌اند از قبیل ویروس واریسـلا زوستر، مونوکلئوز عفونی ویروس اپشـتین بار و عفونت هپاتیت B می‌شوند. بـه علت نبود چنین پاسـخی در دوران کودکی آن‌ها را به سـمت عفونت هپاتیت B مزمن سـوق می‌دهد زیرا پاسخ



شـکل ۷–۷. چگونگی حذف نماتودها از روده. پاسـخ TH2 برای تحریک تولید آنتی‌بادی بسـیار مهم می‌باشد. آنتی‌بادی می‌تواند به کرم آسـیب برسـاند. IgE مرتبط با ماست سـل‌ها، رهایی هیسـتامین و مواد سـلولی نیز در این تخریب شرکت می‌کنند. افزایش ترشـحات مخاطی نیز موجب افزایش تخریب می‌شود. TNF، فاکتورنکروز دهنده تومور، IL؛ اینترلوکین.

کافی برای کشتن سلول‌های آلوده و پاکسازی عفونت وجود ندارد.

عفونت‌های ویروسـی ممکن است محرک فعال‌سازی اولیـه باشـند که به سیسـتم ایمنـی اجـازه می‌دهد به آنتی‌ژن‌های خودی پاسـخ داده و یـا **پروتئین‌هایی** را بیان می‌کند که مشـابه پروتئین‌های میزبان بوده و سبب ایجاد بیماری‌های خودایمنی می‌گردد. طوفان سایتوکاینی بوجود آمده در پاسـخ به آنفولانزا یا سایر عفونت ویروسی ممکن است تحمل محیطی ناشی از سـلول‌های Treg را از بین برده و اجازه آغاز یک پاسخ سـلول CD4T، آنتی‌بادی یا CD-8T علیـه خود در فردی که بصورت ژنتیکی مسـتعد بیماری خودایمنی (نوع MHC) می‌باشد را می‌دهد.

پاسخ‌های ایمنی اختصاصی در برابر قارچ‌ها

پاسـخ ایمنی اولیه علیه عفونت قارچی توسـط اتصال کربوهیدرات‌های دیواره سـلولی قارچ با TLR و دکتین-۱ لکتیـن (dectin-1 lectin)، آغـاز می‌شـود کـه توسـط **نوتروفیل‌هـا**، **ماکروفاژها** و **پپتیدهـای ضدمیکروبی** تولید شـده توسـط نوتروفیل‌ها، سـلول‌های اپی‌تلیال و سایر سـلول‌ها ارائه می‌شـود (کادر ۵–۷). پاسـخ‌های **TH1** و **TH17** سلول CD4T، پاسخ‌های نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها را تحریـک می‌کنند. بیماران دارای نقص در نوتروفیل‌ها یا این پاسخ‌های وابسته به سلول CD4T (مانند بیماران مبتلا به AIDS) به عفونت‌های قارچی (فرصت طلب) حساسـتر هسـتند. ماکروفاژهای فعال شده به وسـیله IFN-γ برای کشتن قارچ‌ها مهم هسـتند. عفونت‌های قارچی می‌توانند باقی مانده، برای دهه‌ها قابل شناسـایی توسط پاسخ‌های

جدول ۴-۷. مثال‌هایی از پاسخ‌های ایمنی ضد انگلی

انگل	محل زندگی	مکانیسم اصلی مؤثر میزبان*	روش فرار
تریپانوزوما بروسی	گردش خون	آنتی‌بادی + کمپلمان	تغییر آنتی‌ژنی
گونه‌های پلاسمودیوم	هپاتوسیت، سلول خونی	آنتی‌بادی، سایتوکین‌ها (TH1)	داخل سلولی، تنوع آنتی‌ژنی
توکسوپلاسما گوندی	ماکروفاژ	متابولیت‌های O2، NO، آنزیم‌های لیزوزومی (TH1)	ممانعت از ادغام با لیزوزوم‌ها
تریپانوزوما کروزی	بسیاری از سلول‌ها	متابولیت‌های O2، NO، آنزیم‌های لیزوزومی (TH1)	فرار از سیتوپلاسم و اجتناب از هضم در لیزوزوم
گونه‌های لیشمانیا	ماکروفاژ	متابولیت‌های O2، NO، آنزیم‌های لیزوزومی (پاسخ TH1 نه TH2)	اختلال انفجار تنفسی و برداشت محصولات، اجتناب از هضم
تریشینلا اسپیرالیس	سیستم گوارشی، خون، عضله	سلول‌های میلوئید، آنتی‌بادی+ کمپلمان (TH2)	کیست شدن در عضله
شیستوزوما مانسونی	پوست، خون، ریه‌ها، سیاهرگ باب	سلول‌های میلوئید، آنتی‌بادی +کمپلمان (TH2)	اکتساب آنتی‌ژن‌های میزبان، مهار آنتی‌بادی، آنتی‌ژن‌های محلول و کمپلکس‌های ایمنی، آنتی اکسیدان‌ها
ووشرریا بانکروفتی	سیستم لنفاوی	سلول‌های میلوئید، آنتی‌بادی+کمپلمان (TH2)	کوتیکول خارج سلولی ضخیم، آنتی اکسیدان‌ها
کرم‌ها	سیستم گوارشی	IgE	کوتیکول خارج سلولی

IgE: ایمونوگلوبین E، NO: اکسید نیتریک، TH: سلول T کمکی

* آنتی‌بادی بیشترین اهمیت را در عفونت‌های خارج سلولی دارد. ایمنی سلولی (پاسخ TH1) بیشترین اهمیت را در عفونت‌های داخل سلولی دارد.

سلول T موثر تحریک شده ایمنی و نوتروفیل‌ها نیستند مگر اینکه در اثر نقص نوتروفیل یا سلول T فرد ضعیف‌شده و عفونت کشنده شود. دیفنسین‌ها و دیگر پپتیدهای کاتیونی ممکن است در برخی از عفونت‌های قارچی (مانند موکورمایکوزیس، آسپرژیلوس) مفید واقع شوند و اکسید نیتریت ممکن است علیه *کریپتوکوکوس* و سایر قارچ‌ها مهم باشد. عفونت تنفسی ناشی از *هیستوپلاسما* سبب می‌شود که عفونت درون سلولی ماکروفاژها باعث برانگیختن پاسخ‌های ایمنی همانند *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* می‌گردد. آنتی‌بادی بعنوان اپسونین ممکن است موجب سهولت پاکسازی قارچ‌ها می‌شود. اما ممکن است همچنین باعث برانگیختن واکنش‌های افزایش حساسیت ایجادکننده بیماری شود. قارچ‌ها و اسپورهای قارچی آلرژن‌های شایع بوده و تحریک‌کننده آسم و آلوئلیت آلرژیک می‌باشند.

پاسخ‌های ایمنی اختصاصی علیه انگل‌ها

مشکل است که راجع به مکانیسم‌های ایمنی ضد انگلی نظر کلی داد زیرا انگل‌های گوناگون دارای فرم‌های انگلی مختلف بوده و در طول سیکل‌های زندگی خود در محل‌های مختلف بافت سکونت دارند (جدول ۴-۷ و کادر ۶-۷). برای عفونت‌های درون سلولی *تحریک پاسخ‌های CD4 TH1، T TH17، CD8TH1، و ماکروفاژ مورد نیاز می‌باشد و برای انگل‌های خارج سلولی موجود در خون و مایعات پاسخ‌های نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و آنتی‌بادی TH2 لازم است.* فعالیت **IgE**، **ائوزینوفیل** و **مست سل** جهت حذف عفونت‌های کرمی (سستود و نماتود) بسیار حائز اهمیت می‌باشند. کارآیی کنترل عفونت ممکن است به این بستگی داشته باشد که کدام پاسخ در میزبان شروع می‌شود. آغاز یک پاسخ TH2 به عفونت لیشمانیا منجر به مهار پاسخ‌های التهابی حفاظتی، ناتوانی در حذف انگل درون سلولی و یک نتیجه ضعیف می‌گردد. این مشاهده مبنایی برای درک این موضوع که پاسخ‌های TH1 و TH2 مجزا و آنتاگونیست هستند را فراهم می‌آورد. انگل‌ها مکانیسم‌های پیچیده‌ای برای فرار از پاکسازی سیستم ایمنی به دست آورده اند و اغلب عفونت‌های مزمن ایجاد می‌کنند.

انگل‌های خارج سلولی از قبیل *تریپانوزوما کروزی* و *توکسوپلاسما* گونده‌ای و گونه‌های *لیشمانیا* توسط

کادر ۶-۷ . خلاصه‌ای از پاسخ‌های ضدقارچی

پاسـخ‌های ایمنی مختلف بسـته به طبیعت انگل و مرحله تکثیری آن ضروری هستند.

بسـیاری از انگل‌ها دارای راهکارهای متعددی جهت فرار از پاسخ‌های ایمنی هستند.

پاسـخ‌های TH2 از طریق ایمنوگلوبولین (Ig)G و IgA با جلوگیـری از اتصال انگل به بافت، مهـار اتصال و ورود به درون سلول‌ها، فعال‌سازی کمپلمان و همچنین اپسونین مهم هستند.

IgE به سـلول‌های مست متصل می‌شـود و ائوزینوفیل‌ها به انگل و آنتـی‌ژن انگل متصل می‌گردند و هیسـتامین و ماده‌های توکسـیک را برای تقویـت از بین بردن انگل آزاد می‌کند.

پاسـخ‌های TH2 ترشـح موکوس بـه درون کولون جهت تقویت از بین بردن انگل را فعال می‌کنند.

پاسـخ‌های TH1 به ویژه برای عفونت‌های درون سـلولی (لیشمانیا) مهم هستند اما التهاب را تقویت می‌کنند. تشکیل گرانولوما برای عفونت‌های درون سـلولی (شیستوزوما) مهم است.

پاسـخ‌های TH17 فعالیـتِ اپی‌تلیـال و نوتروفیل را برای انگل‌های خارج سلولی مجدداً فعال می‌کنند.

ماکروفاژ فاگوسـیتوز می‌شـوند. آنتی‌بادی ممکن اسـت برداشت (اپسونیزه شـدن) انگل‌ها را تسهیل نماید. کشتار انگل‌ها به دنبال فعال شـدن ماکروفاز به وسـیله IFN-γ (تولیـد شـده توسـط NK ، Tγ/δ یا سـلول‌های CD4 TH1) یا TNF-α (تولید شـده توسط سـایر ماکروفاژها) و تحریک مکانیسـم‌های کشتار وابسته به اکسیژن (پراکسید، سوپراکسـید، نیتریک اکسـید) صورت می‌گیـرد. انگل‌ها ممکن اسـت در ماکروفاژ تکثیر یابند و از شناسـایی شدن توسـط سیسـتم ایمنی پنهان بمانند مگر اینکه ماکروفاژ توسط پاسخ‌های TH1 فعال شود.

تولید IFN-γ توسـط TH1 و فعال شـدن ماکروفاژها جهت دفاع علیه پروتوزوآهای درون سـلولی و برای ایجاد گرانولوماها اطراف تخم‌های شیستوزوما مانسونی و کرم‌ها در کبد ضروری می‌باشند. گرانولوما تشکیل شده به وسیله لایه‌ای از سـلول‌های التهابـی، کبد را از توکسـین‌های تولید شده توسـط تخم‌ها محافظت می‌نماید. با این وجود گرانولوما سبب فیبروز نیز می‌گردد که سبب مسدود کردن ورید فراهم کننده خون برای کبد شـده و منجر به افزایش فشار خون و سیروز می‌گردد.

نوتروفیل‌ها انگل‌های خارج سلولی را فاگوسیتوز می‌کنند و توسـط مکانیسم‌های وابسته به اکسیژن و غیر وابسته به اکسیژن آن‌ها را می‌کشند. ائوزینوفیل‌ها مجاور انگل‌ها قرار می‌گیرند و بـه IgG و IgE روی سـطح لاروها یا کرم‌ها (مانند: کرم‌ها، *شیستوزوما مانسونی* و *تریشینلا اسپیرالیس*) متصل می‌شوند و در اثر اتصال گرانول‌های داخل سلولی با غشاء پلاسمایی و رها کردن پروتئین بازی اصلی (Major Basic Protien) بـه درون فضای بین سـلولی دگرانوله می‌شـوند. پروتئین بازی اصلی برای انگل سمی می‌باشد.

بـرای عفونت‌هـای کرمـی انگلـی، IL4 و سـایر سـایتوکین‌هایی که توسط سلول‌های اپی‌تلیال، سلول‌های لنفوئیدی ذاتی و T سـل‌های CD4 TH2 تولید می‌شـوند اهمیت زیادی برای تحریک تولید IgE و فعال کردن مست سـل‌ها دارند (شـکل ۷-۷). IgE به گیرنده‌های FC روی ماست‌سل‌ها یعنی سـلول‌های آلوده به آنتی‌ژن‌های انگلی متصل می‌شـود. در مجرای روده آنتـی‌ژن به IgE موجود بر روی ماست‌سـل متصل شـده و اتصال متقاطع برقرار می‌نماید و آزادسـازی هیستامین و مواد سمی برای انگل را تحریک می‌کند و ترشـحات مخاطی را به منظور پوشاندن و دفع کرم افزایش می‌دهد. پاسـخ‌های TH2 نیز ترشـح موکوس را تقویت می‌کنند تا کرم را پوشـانده و سـبب از بین رفتن آن شوند.

آنتی‌بـادی IgG نقش مهمـی در ایمنی ضد انگلی به صورت اپسـونین ایفا می‌کند و سبب فعال کردن کمپلمان روی سطح انگل می‌شود.

مالاریـا یک درگیـری جالبی با سیسـتم ایمنی دارد. آنتی‌بادی‌هـای محافظتی علیه پروتئین‌های سـطحی و اتصالی انگل ساخته می‌شوند، ولی این‌ها در مراحل مختلف تکامل انگل متفاوت‌اند. پاسـخ ایمنی TH1 و پاسخ سلولی CTL ممکن اسـت در طی مرحله کبدی انگل مهم باشند. در حالی که در فاز اریتروسـیتی، انگل از آنتی‌بادی مخفی می‌ماند و توسـط CTLs قابل شناسایی نیست، ولی باعث تحریک پاسخ‌های سلول NK و NKT می‌شوند. سیتوکین‌ها

به خصوص TNF-α تولیدشـــده توسط این سلول‌ها، باعث تقویت ایمنـــی و ایمونوپاتوژنز می‌شـــود. کمپلکس ایمنی که حـــاوی اجزاء انگل مالاریا و بقایای ســـلولی اســـت از اریتروسیت‌های پاره‌شده آزاد می‌شوند و می‌توانند در درون مویرگ‌ها لخته ایجاد کنند و بدین ترتیب باعث فعال شدن حساســـیت شـــدید نوع II (مباحث بعدی را ببینید) و آسیب بافتی توسط التهاب شوند.

فرار انگل‌ها از مکانیسم‌های ایمنی

انگل‌های حیوانی مکانیسم‌های مشخصی را برای ایجاد عفونت‌هـــای مزمن در میزبان مهره‌دار بکار می‌برند (جدول ۴-۷ را ببینید). این مکانیســـم‌ها شامل رشد داخلی سلولی، غیر فعال کردن کشـــتار فاگوســـیتوزی، آزاد کردن آنتی‌ژن بلوکان (مانند *تریپانوزوما بروسئی*، *پلاسمودیوم فالسیپاروم*) و گسترش کیست‌ها (مانند پروتوزوآها: *آنتاموبا هیستولیتیکا*، کرم‌ها: تریشنلا *اسپیرالیس*) برای محدود کردن دسترسی پاسخ ایمنی می‌باشـــد. تریپانوزوماهای آفریقایی می‌توانند ژن‌هایـــی را برای آنتی‌ژن ســـطحی خـــود (گلیکوپروتئین ســـطحی متغییر) دوباره مهندســـی کنند و در نتیجه ظاهر آنتی‌ژنی خود را تغییر دهند. شیســـتوزوماها می‌توانند خود را با آنتی‌ژن‌های میزبان شامل ملکول‌های MHC بپوشانند.

سایر پاسخ‌های ایمنی

پاسخ‌های ضد توموری و **رد پیوندهای بافتی** در مراحل اولیه بواسطه پاسخ ایمنی سایتولیتیک سلول TH1 صورت می‌گیرد (انیمیشن ۱۰). T ســـل‌های CD8 سایتوتوکسیک پپتیدهای بیان شـــده بر روی تومورها را شناســـایی کرده و تومورهایـــی را کـــه پپتیدهایـــی از پروتئین‌های جنینی، پروتئین‌های جهش یافته یا ســـایر پروتئین‌های موجود بر روی مولکول‌هـــای MHC کلاس I (عرضه پپتید از طریق مسیر اندوژن) بیان نموده‌اند از بین می‌برند. این پروتئین‌ها ممکن است در حالت نامناسب در سلول توموری بیان شده باشند و ممکن است پاسخ ایمنی میزبان نسبت به آن تحمل نکند. اغلب تومورها پاسخ‌های ترمیم‌سازی زخم از ماکروفاژ M2 را فعال نموده (مدل‌ســـازی مجدد بافت و آنژیوژنز) و مهار ایمنی سلول‌های T را تقویت می‌کنند.

رد **آلوگرافت‌ها** توســـط سلول T که در طی پیوندهای بافتی اســـتفاده می‌شود به وسیله شناسایی پپتیدهای بیگانه بیان شـــده بر روی آنتی‌ژن‌های MHC-I سلول‌های بیگانه آغاز می‌گردد. آنتی‌بادی تولیدشده علیه آنتی‌ژن‌های بیگانه می‌توانند نیز سبب رد گراف از طریق فعال‌سازی کمپلمان و کشتار سایتوتوکسیتی سلولی وابسته به آنتی‌بادی شود.علاوه بر اینکه میزبان بافت پیوند شـــده را رد می‌کند، سلول‌های فرد اهداء کننده خون یـــا پیوند بافتی می‌تواند علیه میزبان جدید واکنش نشان داده که به آن **پاسخ میزبان علیه پیوند (GVH)** گویند. یک آزمایش در شـــرایط آزمایشـــگاه برای بررسی فعالیت رشد سلول‌های T در یک پاسخ شبه GVH، معمولاً **مخلوطی از فعالیت لنفوسیت** را نشان می‌دهد.

ایمونو پاتوژنز

پاسخ‌های ازدیاد حساسیت

زمانی که پاســـخ ایمنی فعال می‌گـــردد گاهی اوقات کنترل آن مشـــکل بوده و ســـبب آســـیب بافتی می شود. واکنش‌هـــای ازدیاد حساســـیت عامل بســـیاری از علائم مربوط به عفونت‌های میکروبی هستند. واکنش‌های ازدیاد حساســـیت، در افرادی رخ می‌دهد که قبـــلاً علیه آنتی‌ژن ایمنی ایجـــاد کرده‌اند. *بر اســـاس دوره زمانی و مدیاتورها* چهار نوع پاسخ ازدیاد حساسیت شناسایی شده است (جدول ۵-۷). انواع I تا III به واســـطه آنتی‌بـــادی بوده و نوع IV پاسخ‌های به واسطه سلول می‌باشد.

ازدیاد حساســـیت تیپ I توســـط **IgE** ایجاد می‌شود و در ارتبـــاط با واکنش‌های **آلرژی**، **آتوپیک** و **آنافیلاکســـی** می‌باشد (شکل ۸-۷ و انیمیشن ۱۱ را ببینید). واکنش‌های آلـــرژی IgE واکنش‌هایی با آغاز ســـریع هســـتند. IgE به گیرنده‌های Fc روی مســـت سل‌ها متصل شده و به عنوان گیرنده‌های ســـطحی بـــرای آنتی‌ژن‌هـــا **(آلرژن‌ها)** عمل می‌کنـــد. اتصـــال متقاطع بین چندین ملکول IgE ســـطح سلول توسط آلرژن (مانند گرده) منجر به تخلیه گرانول‌ها، رهایی **جاذبه‌های شـــیمیایی** (کموکین‌ها، لکوترین‌ها) برای جذب ائوزینوفیل‌ها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های تک هسته‌ای، **واســـطه‌های شـــیمیایی** (هیســـتامین، فاکتـــور فعال‌کننده پلاکت، تریپتاز، کینینوژناز، ســـایتوکین‌ها) برای انبســـاط

جدول ۵-۷. واکنش‌های ازدیاد حساسیت

نوع واکنش	زمان آغاز	خصوصیات کلیدی	اثرات مفید	اثرات جانبی
تیپ I	کمتر از ۳۰ دقیقه	آنتی‌ژن محلول موثر، تولید آزادسازی واسطه‌های موثر بر روی عروق وابسته به IgE	پاسخ‌های ضد انگلی و خنثی سازی سم	آلرژی‌های موضعی (مانند تب یونجه، آسم)، آنافیلاکسی سیستمیک
تیپ II	کمتر از ۸ ساعت	آنتی‌بادی متصل به سلول سبب افزایش سایتوتوکسیته وابسته به C، اتصال و تنظیم گیرنده می‌شود.	لیز مستقیم و فاگوسیتوز باکتری‌های خارج سلولی و سایر میکروب‌های حساس	تخریب سلول‌های قرمز خون (مانند واکنش‌های انتقال خون، بیماری Rh)، صدمه بافتی اختصاصی ارگان در برخی از بیماری‌های خود ایمنی (مانند سندرم گود پاسچر).
تیپ III	کمتر از ۸ ساعت	کمپلکس‌های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن فعال کننده C	واکنش التهابی حاد، در محل باکتری‌های خارج سلولی و پاکسازی آن‌ها	واکنش آرتوس (موضعی)، بیماری سرم و واکنش‌های دارویی (ژنرالیزه)، بیماری‌های خودایمنی سیستمیک.
تیپ IV	۲۴ تا ۷۲ ساعت (حاد)، بیشتر از یک هفته (مزمن)	آنتی‌ژن محلول فاگوسیت‌شده به سلول‌های CD4 T عرضه می‌شود و منجر به فعال‌سازی ماکروفاژها و التهاب می‌شود.	حفاظت علیه عفونت ناشی از قارچ‌ها، باکتری‌های درون سلولی و ویروس‌ها	حاد: درماتیت تماسی، تست پوستی توبرکولین. مزمن: تشکیل گرانولوما، رد پیوند.

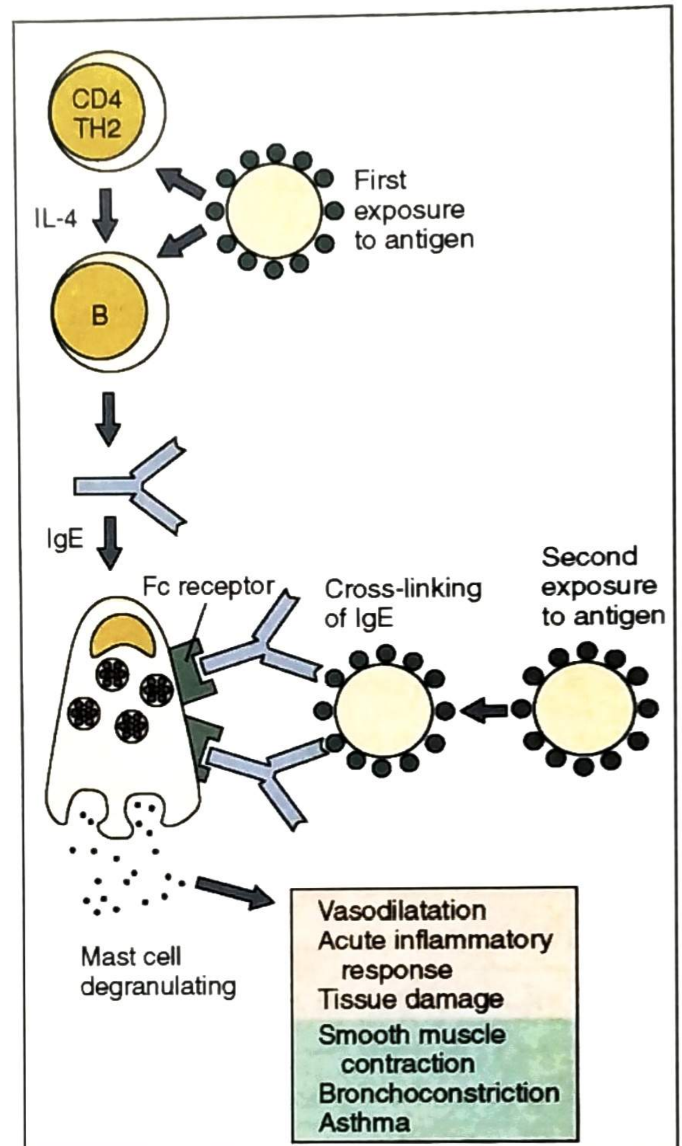
Ig، ایمونوگلوبولین.

عروق و ادم و اسپاسموژن‌ها (هیستامین، پروستاگلاندین D_2، لکوترین‌ها) جهت اثر مستقیم بر روی ماهیچه‌های صاف برونشیول‌ها و تحریک ترشح مخاط می‌شود. بعد از ۸ تا ۱۲ ساعت واکنش به علت نفوذ ائوزینوفیل‌ها و سلول‌های CD4 T و سایتوکاین تقویت کننده التهاب ایجاد می‌شود. حساسیت زدایی (از بین بردن آلرژی) موجب تولید IgG می‌شود که با اتصال به آلرژن مانع از چسبیدن آن به IgE می‌شود.

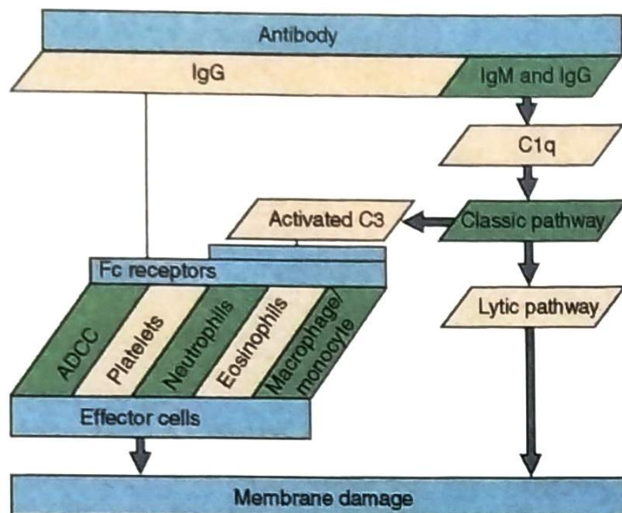
ازدیاد حساسیت تیپ II در اثر **اتصال آنتی‌بادی به ملکول‌های سطح سلول** بیان می‌شود و به دنبال آن آنتی‌بادی منجر به فعال شدن پاسخ‌های سایتولیتیک به کمک آبشار کلاسیک کمپلمان یا توسط سایتوتوکسیتی سلولی وابسته به آنتبادی می‌گردد (شکل ۹-۷). این واکنش‌ها در طی ۸ ساعت اول پس از انتقال خون یا بافت و یا بعنوان بخشی از بیماری مزمن رخ می‌دهد. مثال‌هایی از این واکنش‌ها شامل آنمی همولیتیک اتوایمیون و سندرم گودپاسچر (آسیب غشاء پایه کلیه و ریه) می‌باشد. مثالی دیگر بیماری همولیتیک نوزادان (نوزادان آبی) است که در نتیجه واکنش آنتی‌بادی مادری تولید شده در حاملگی اول نسبت به فاکتورهای Rh موجود بر روی اریتروسیت‌های بچه دوم است (ناسازگاری Rh).

مهار یا فعالسازی آنتی‌بادی ضد رسپتور نیز به عنوان پاسخ تیپ II در نظر گرفته می‌شود. میاستنی گراویس به خاطر تولید آنتی‌بادی علیه گیرنده‌های استیل‌کولین روی نورون‌هاست. بیماری گراویس ناشی از تحریک آنتی‌بادی علیه گیرنده هورمون تحریک‌کننده تیروئید (TSH) است در حالیکه بعضی از انواع دیابت می‌تواند به خاطر آنتی‌بادی‌های مهارکننده گیرنده انسولین باشد.

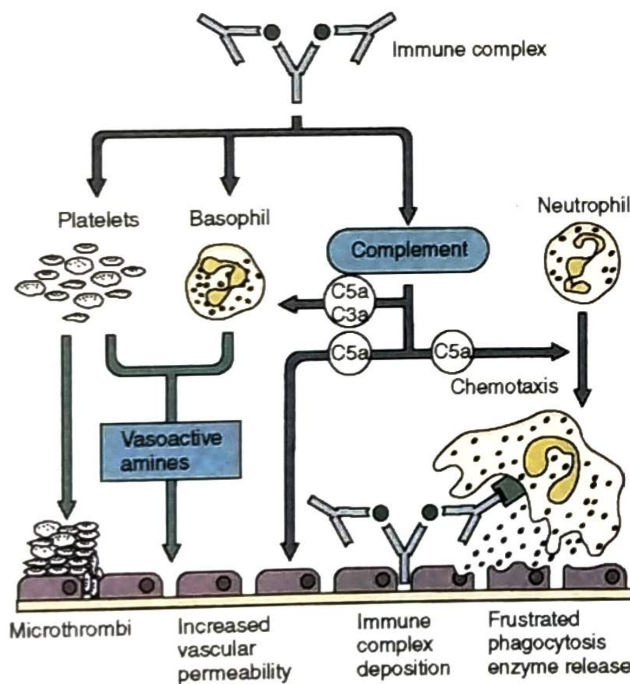
پاسخ‌های ازدیاد حساسیت تیپ III در نتیجه فعال شدن کمپلمان به وسیله کمپلکس‌های ایمنی است (شکل ۱۰-۷). در حضور مقادیر فراوان آنتی‌ژن محلول در خون کمپلکس‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی تشکیل می‌شود که در مویرگ‌ها (به ویژه در کلیه) به دام می‌افتند و موجب فعالیت آبشار کلاسیک کمپلمان می‌گردد. فعالیت آبشار کمپلمان منجر به آغاز پاسخ‌های التهابی می‌شود. بیماری کمپلکس ایمنی ممکن است در اثر عفونت‌های پایدار (مانند هپاتیت B، مالاریا، اندوکاردیت عفونی ناشی از استافیلوکوکوس، گلومرولونفریت مرتبط با استرپتوکوکوس گروه A) یا در اثر اتوایمیونیتی (مانند آرتریت روماتوئید، لوپوس اریتماتوز سیستمیک) یا تنفس مداوم آنتی‌ژن (مانند آنتی‌ژن‌های



شکل ۸-۷. ازدیاد حساسیت تیپ I: واکنش‌های موضعی وابسته به ایمونوگلوبین E (IgE) و آنافیلاکسی. IgE تولید شده در پاسخ به درگیری اولیه به گیرنده‌های موجود بر روی ماست سل‌ها و بازوفیل متصل می‌شود. آلرژن وقتی به IgE سطح سلول متصل شود سبب رهایی هیستامین و پروستاگلاندین‌های حاصل از گرانول‌ها برای بروز علائم می‌شود. مثال‌ها شامل تب یونجه، آسم، آلرژی به پنی‌سیلین و واکنش در برابر نیش زنبور می‌باشند. IL : اینترلوکین TH، سلول T کمکی.



شکل ۹-۷. ازدیاد حساسیت تیپ II: توسط آنتی‌بادی و کمپلمان واسطه گری می‌شود. فعال‌سازی کمپلمان موجب افزایش تخریب مستقیم سلول از طریق آبشار کمپلمان و فعال‌سازی سلول‌های موثر (Effector) می‌شود. مثال‌ها شامل سندروم گودپاسچر، پاسخ به فاکتور Rh در نوزادان، اندوکرینوپاتی خودایمن می‌باشند. ADCC: سایتوتوکسوسیتی سلولی وابسته به آنتی‌بادی، Ig: ایمونوگلوبولین.



شکل ۱۰-۷. ازدیاد حساسیت تیپ III: رسوب کمپلکس ایمنی. کمپلکس‌های ایمنی در کلیه و سایر نقاط بدن به دام می‌افتند و می‌توانند منجر به فعال شدن کمپلمان و سایر پاسخ‌های مخرب شوند. مثال‌ها شامل بیماری سرم، نفریت مرتبط با عفونت مزمن هپاتیت B و واکنش آرتوس می‌باشند.

جدول ۶-۷. ویژگی‌های مهم چهار نوع واکنش ازدیاد حساسیت نوع تأخیری

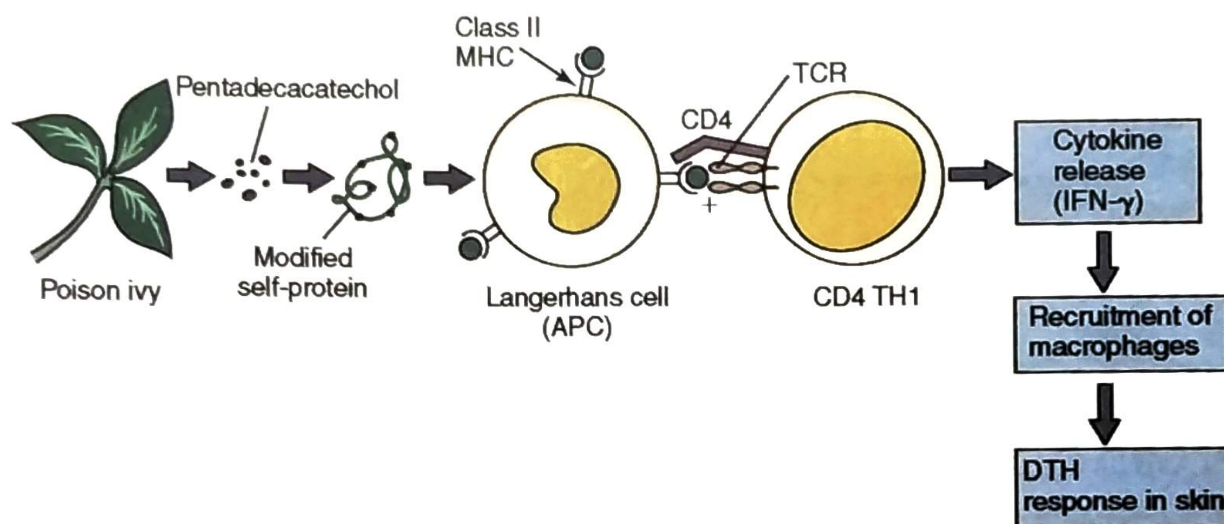
نوع	زمان واکنش	تظاهر بالینی	تظاهر بافتی	آنتی‌ژن
جونز – موت	۴۸-۲۴ ساعت	تورم پوستی	بازوفیل‌ها، لنفوسیت و سلول‌های تک هسته‌ای	آنتی‌ژن داخل جلدی: واکنش با PPD با دیگر آنتی‌ژن پروتئینی
تماسی	۴۸ ساعت	اگزوما	سلول‌های تک هسته‌ای، ادم، اپیدرم برآمده	اپیدرمی: نیکل، رزین، پیچک سمی
توبرکولین	۴۸ ساعت	سفتی موضعی و تورم همراه با بدون تب	سلول‌های تک هسته‌ای، لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و ماکروفاژهای کاهش یافته	جلدی: توبرکولین (PPD)، مایکوباکتریومی و لیشمانیایی
گرانولوماتوز	۴ هفته	سفتی پوست	گرانولوما، سلول اپی‌تلوئید، سلول‌های غول پیکر، ماکروفاژها، فیبروز با یا بدون نکروز	آنتی‌ژن پایدار یا کمپلکس‌های آنتی‌ژن-آنتی‌بادی در ماکروفاژها یا مواد غیر ایمونولوژیک (مانند پودر تالکوم talcum powder).

کپک، گیاهی و حیوانی) حاصل شود. مثلاً عفونت هپاتیت B مقادیر فراوانی از آنتی ژن سطحی خود را تولید می‌کند که ممکن است موجب تشکیل کمپلکس ایمنی و متعاقب آن گلومرولونفریت شود. واکنش‌های ازدیاد حساسیت نوع III در افراد از قبل حساس در اثر تزریق داخل پوستی آنتی‌ژن منجر به بروز واکنش آرتوس (Arthus Reaction) می‌شود که نوعی واکنش پوستی همراه با تورم و قرمزی است. ایمونیزاسیون یادآور سالانه آنفلوآنزا ممکن است سبب برانگیختن واکنش آرتوس در جایگاه وارد نمودن ایمونیزاسیون گردد که این به دلیل وجود آنتی‌بادی به وجود آمده از ایمونیزاسیون انجام شده در سال قبل اتفاق می‌افتد. بیماری سرم، التهاب آلوئلی آلرژیک خارجی (یک واکنش به آنتی‌ژن قارچی تنفس شده) و گلومرولونفریت از انواع واکنش‌های ازدیاد حساسیت تیپ III هستند. بیماری سرم می‌تواند به دنبال دریافت ایمونوگلوبولین (مثلاً ضد سم مار) در موارد متعدد رخ دهد.

پاسخ‌های نوع **IV ازدیاد حساسیت**، پاسخ‌های التهابی ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH) وابسته به TH1 هستند (شکل ۱۱-۷ و جدول ۶-۷). معمولا ۲۴ تا ۴۸ ساعت طول می‌کشد تا آنتی‌ژن به **سلول‌های TCD4 عرضه شود و سپس این سلول‌ها ماکروفاژ را فعال کنند** که منجر به ایجاد پاسخ می‌شود. با وجودی که این نوع واکنش برای کنترل عفونت‌های قارچ‌ها و باکتری‌ها داخل سلولی (مانند مایکوباکتریوم) ضروری است ولی DTH همچنین مسئول ایجاد **درماتیت تماسی** (Contact Dermatitis) در اثر تماس (مثلاً مواد آرایشی، نیکل) و پاسخ به **پیچک سمی** می‌باشد. تزریق داخل جلدی آنتی‌ژن توبرکولین (پروتئین مشتق شده خالص [PPD]) پس از حداکثر ۴۸ تا ۷۲ ساعت موجب ایجاد تورم سفت و محکمی می‌شود که نشان دهنده برخورد قبلی با *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* است (شکل ۱۲-۷). افزایش حساسیت **گرانولوماتوز** در بیماری‌هایی نظیر توبرکلوزیس، جذام، شیستوزومیازیس، سارکوئیدوزیس و بیماری کرون اتفاق می‌افتد. **گرانولوماها** (Granulomas) در پاسخ به تحریک مداوم به وسیله رشد داخل سلولی مایکو باکتریوم توبرکلوزیس ایجاد می‌شوند. این ساختارها از سلول‌های اپی‌تلوئیدی حاصل از ماکروفاژهای فعال شده به شکل مزمن و سلول‌های اپیتلوئیدی ادغام شده (سلول‌های غول پیکر چند هسته‌ای) تشکیل شده‌اند که توسط لنفوسیت‌ها و فیبروز که در نتیجه رسوب کلاژن فیبروبلاست‌ها ایجاد می‌شود احاطه شده‌اند. این گرانولوماها از پخش شدن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تا زمانی که سلول‌های TCD4 منجر به تولید IFN-γ شوند جلوگیری می‌کنند.

طوفان سایتوکینی

سپسیس، سندرم شوک توکسیک (توسط توکسین سندرم شوک توکسیک *استافیلوکوکسی* ایجاد می‌شود)، بعضی از عفونت‌های ویروسی (مانند سندرم حاد تنفسی (SARS) و آنفلوآنزا)، بیماری تقابل میزبان و بافت پیوندی یک پاسخ



شکل ۱۱-۷. ازدیاد حساسیت تیپ IV: ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH) به واسطه سلول‌های TCD4 (TH1) ایجاد می‌شود. در این مورد پروتئین‌های خودی تغییر یافته از لحاظ شیمیایی پردازش شده و به سلول‌های TCD4 عرضه می‌شوند که موجب رهایی سایتوکین‌ها (شامل اینترفرون گاما (IFN-γ)) می‌شوند که التهاب را افزایش می‌دهد. مثال‌هایی دیگر از DTH شامل پاسخ توبرکولین (تست مشتقات پروتئینی خالص شده [PPD]) و واکنش در برابر فلزاتی همچون نیکل می‌باشند. APC : سلول عرضه کننده آنتی‌ژن، TCR : گیرنده سلول T .

کلی ایمنی ذاتی و یا اختصاصی را القا می‌کند که به موجب آن، مقدار زیادی از سایتوکین‌ها تولید می‌شوند که باعث تخریب فیزیولوژی بدن می‌شوند. نتیجه این به هم خوردن تنظیم سیستمیک، راش، تب و شوک است. سوپر آنتی‌ژن‌ها همزمان به TCR و MHCII که روی سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن قرار دارد متصل می‌شود و تا ۲۰ درصد از سلول‌های T را فعال می‌کنند. این مسئله سبب آزاد شدن غیر کنترل‌شده سیتوکین‌های تولیدشده توسط سلول‌های T و ماکروفاژها می‌شود تا زمانی که سلول‌های T در اثر آپوپتوز از بین روند. باکتری‌ها، اندوتوکسین‌ها یا ویروس‌ها در خون می‌توانند سبب تولید مقدار زیادی از سیتوکین‌های فاز حاد و انترفرون نوع یک توسط سلول‌های دندریتیک پلاسما سیتوئید شوند و ویروس‌های خاصی بسیار مستعد فعالسازی تولید سایتوکین و اینترفرون می‌باشند. در طی طوفان‌های سایتوکینی میزان زیادی TNF-α تولید می‌شود. TNF-α می‌تواند باعث تقویت پاسخ‌های التهابی از قبیل افزایش نشت رگ‌ها و فعال‌سازی نوتروفیل‌ها می‌شود بنابراین در سطح موضعی عملکرد آن می‌تواند مفید باشد ولی در سطح سیستمیک می‌تواند باعث تب، لرز، تحریک مسیر کوآگلوتیناسیون، افزایش آنزیم‌های کبدی، از دست دادن اشتها، افزایش متابولیسم، کاهش وزن و به طور بالقوه شوک می‌شود.

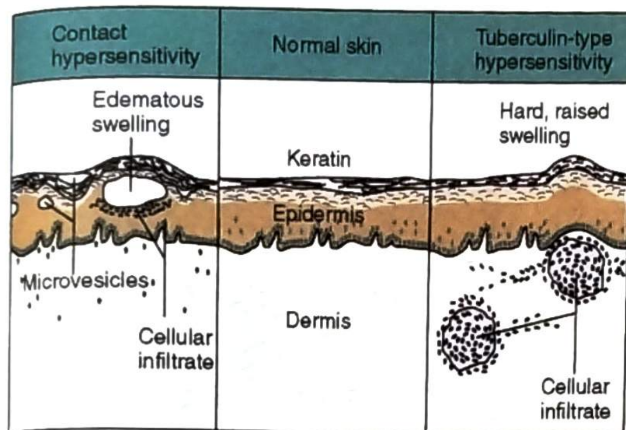
پاسخ‌های اتوایمیون

به طور طبیعی هر فردی در برابر آنتی‌ژن‌های خودی در طی تکامل سلول‌های T و سلول‌های B و به وسیله سلول‌های T تنظیمی، تحمل کسب می‌نماید. خودایمنی می‌تواند توسط هر یک از موارد ذکرشده در ادامه تحریک شود: غلبه کردن بر تحمل ایجادشده توسط Treg از طریق تولید سایتوکین زیاد (مانند طوفان سایتوکاینی، لوپوس اریتروماتوز سیستمیک)، واکنش متقاطع با آنتی‌ژن‌های میکروبی (مثلا عفونت ناشی از استرپتوکوکوس گروه A، تب روماتیسمی)، فعال شدن پلی‌کلونال لنفوسیت‌ها در اثر تومورها یا عفونت (مانند مالاریا، عفونت ناشی از اپشتین بار) یا زمینه ژنتیکی سوق دهند، بیان پپتیدهای آنتی‌ژنیک خودی (وابسته به MHC) یا فقدان تحمل نسبت به آنتی‌ژن‌های اختصاصی بوجود می‌آید، رخ دهد.

بیماری‌های خود ایمنی ناشی از حضور آنتی‌بادی‌های خودی، سلول‌های T فعال شده و واکنش‌های ازدیاد حساسیت می‌باشد. افرادی که دارای آنتی‌ژن‌های MHC خاصی هستند در معرض خطر بالاتری در برابر پاسخ‌های خود ایمنی هستند (مانند: HLA-B27: آرتریت روماتوئید جوانی، اسپوندیلیت آنکلیوزونی). بعد از فعالسازی، یک

جدول ۷-۷. عفونت‌های مرتبط با نقص‌های پاسخ ایمنی

نقص	پاتوژن
القاء به وسیله روش‌های فیزیکی	پسودوموناس آئروژینوزا استافیلوکوکوس اورئوس استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس استرپتوکوکوس پایوژنز گونه‌های آسپرژیلوس گونه‌های کاندیدا
اسپلکتومی	باکتری‌ها و قارچ‌های دارای کپسول
نقص‌های مونوسیت و گرانولوسیت در حرکت، فاگوسیتوز یا کشتار یا کاهش تعداد سلول‌ها (نوتروپنی)	استافیلوکوکوس اورئوس استرپتوکوکوس پایوژنز استرپتوکوکوس پنومونیه هموفیلوس آنفلوآنزا اشریشیاکلی گونه‌های کلبسیلا پسودوموناس آئروژینوزا گونه‌های نوکاردیا گونه‌های آسپرژیلوس گونه‌های کاندیدا
اجزاء انفرادی سیستم کمپلمان	استافیلوکوکوس اورئوس استرپتوکوکوس پنومونیه گونه‌های پسودوموناس گونه‌های پروتئوس گونه‌های نایسریا
سلول‌های T	هرپس ویروس‌ها (HSV، EBV، CMV، HHV6، HHV7، HHV8 پولیوماویروس‌ها (JC، BK) لیستریا مونوسایتوژنز گونه‌های مایکوباکتریوم گونه‌های نوکاردیا گونه‌های آسپرژیلوس گونه‌های کاندیدا کریپتوکوکوس نئوفورمنس هیستوپلاسما کپسولاتوم پنوموسیستیس جیرووسی توکسوپلاسما استرنژیلوئیدس استرکولاریس
سلول‌های B	انتروویروس‌ها استافیلوکوکوس اورئوس گونه‌های استرپتوکوکوس هموفیلوس آنفولانزا نایسریا مننژیتیدیس اشریشیاکلی ژیاردیا لامبلیا پنوموسیستیس جیروسی
نقص ایمنی مرکب	پاتوژن‌های لیست شده برای سلول‌های T و سلول‌های B را ببینید



شکل ۱۲-۷. پاسخ‌های ازدیاد حساسیت توبرکولین و تماسی. این پاسخ‌های تیپ ۴ وابسته به سلول هستند اما در محل اینفیلتراسیون سلولی و بروز علائم متفاوت هستند. ازدیاد حساسیت تماسی در اپیدرم منجر به تشکیل تاول‌ها می‌شود، ازدیاد حساسیت نوع توبرکولین در درم رخ می‌دهد و به وسیله تورم مشخص می‌شود.

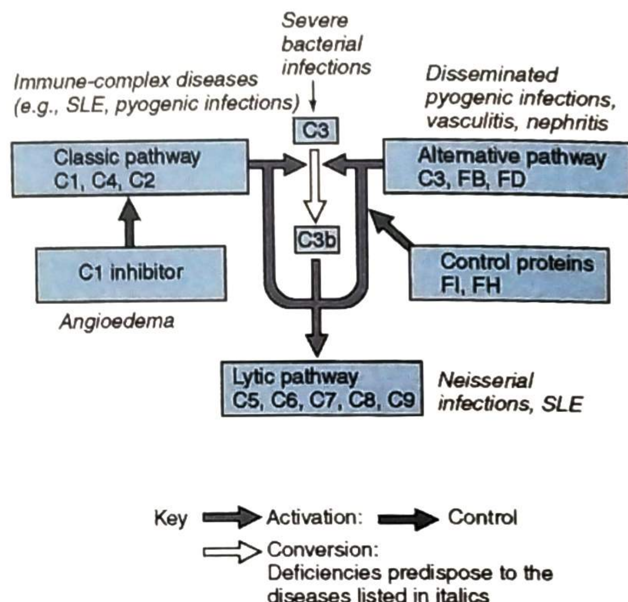
چرخه بین سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن و سلول‌های T ایجاد می‌شود که باعث تولید سیتوکین‌های تقویت‌کننده التهاب و تخریب بافتی و آنتی‌ژن‌های خودی بیشتری می‌شود. پاسخ‌های TH1 و TH17 مسئول آرتریت رماتوئید و سایر بیماری‌هاست.

نقص ایمنی

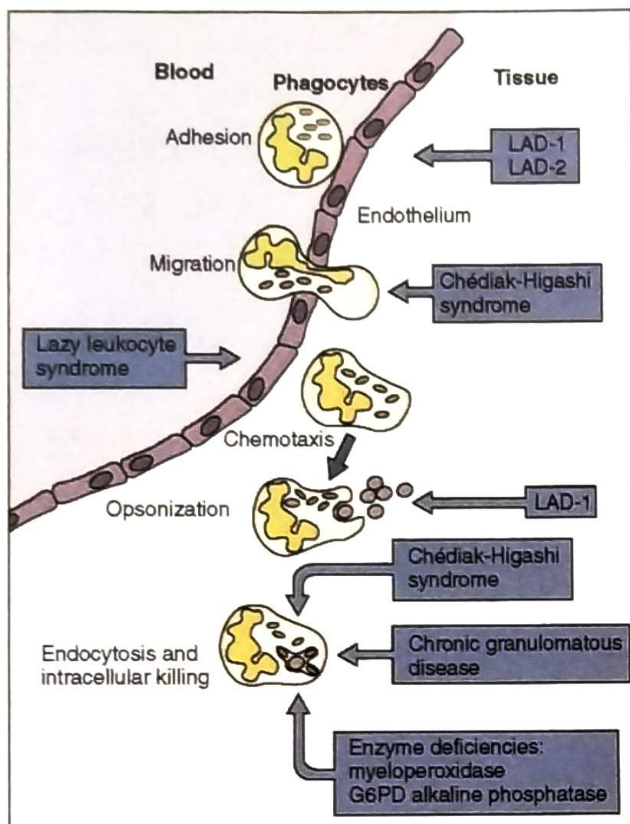
نقص ایمنی ممکن است در نتیجه نقص‌های ژنتیکی، گرسنگی، سرکوب ایمنی در نتیجه دارو (مانند درمان استروئیدی، شیمی درمانی سرطان، شیمی درمانی به منظور مهار رد پیوند بافتی)، سرطان (به ویژه سلول‌های ایمنی) یا بیماری (مانند AIDS) رخ دهد و به طور طبیعی در نوزادان و خانم‌های حامله نیز اتفاق می‌افتد. وجود نقص‌ها در پاسخ‌های حفاظتی خاص بیمار را در خطر بالای بیماری شدید ایجاد شونده به وسیله عوامل عفونی که باید توسط این پاسخ کنترل شوند قرار می‌دهد (جدول ۷-۷). این «تجربیات طبیعی» اهمیت پاسخ‌های خاص در کنترل عفونت‌های خاص را بیان می‌کند.

سرکوب ایمنی

درمان سرکوب کننده ایمنی برای کاهش التهاب



شکل ۱۳-۷. نتایج حاصل از نقص در مسیرهای کمپلمان: نقص در فعال‌سازی یا کنترل کمپلمان می‌تواند منجر به بیماری شود. عدم توانایـــی در تولید اجزا C3 , C5، فراخوانـــی نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها، اوپسونیزاسیون و پاکسازی باکتری‌ها و پروتئین‌ها و فعال‌سازی سـلول‌های B را دچار نقص می‌کند. عدم وجود مهار کننده‌ها امکان فعال شدن غیرمعمول و التهاب را فراهم می‌سازد. SLE، لوپوس اریتماتوز سیستمیک



شـکل ۱۴-۷. نتایج نقص عملکرد فاگوسـیت. ناتوانی در درک، دسترسـی به عفونت یا اتصـال، ورود، یا کشـتار باکتری‌های وارد شـده سبب افزایش حساسـیت به بیماری باکتریایی جدی می‌شود. G6PD : گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز، LAD-1 : نقص چسبندگی لوکوسیتی یک.

بیش از اندازه یا پاسـخ‌های ایمنی یا برای پیشگیری از رد پیوندهای بافت به وسیله سلول‌های T، حائز اهمیت است. درمان، علائم، فعال‌کننده یا میانجی پاسخ را مورد هدف قرار می‌دهد. آسـپرین و داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی (NSAIDs) سیکواکسیژنازها که پروستاگلاندین‌های التهابی (ماننـد PGD_2) و درد را تولید می‌کنند، هدف قرار می‌دهند. کورتیکو اسـتروئیدها مانـع از تولید آن‌هـا از ماکروفاژها می‌شـوند و ممکن است برای سـلول‌های T سمی باشند. اشـکال محلول گیرنده TNF-α و آنتی‌بادی علیه TNF-α می‌توانند جهت مهار اتصال TNF-α و جلوگیری از فعالیت آن مورد اسـتفاده قـرار گیرند. آنتی‌بادی‌هـا علیه IL-12، IL-23، IL-1 و دیگر سایتوکین‌ها، پروتئین‌های چسبنده روی سلول‌های T، یا سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن، می‌توانند فعال شدن پاسـخ‌های التهابی، علیه بافت پیوندی و سایر پاسخ‌های سـلول T را مهار نمایند. **درمان ایمونوساپرسیو** **مورد اسـتفاده** بـرای پیوند معمولاً فعالیت سـلول‌های T را مهار می‌کند یـا آن‌ها را لیز می‌نماید. سیکلوسـپورین، تاکرولیموس (FK-506) و راپامایسـین مانع از فعال شدن سلول‌های T می‌شوند (شـکل ۳-۹ را ببینید). آنتی لیگاند CD40 و آنتی IL-2 از فعال شـدن سلول‌های T جلوگیری می‌کنند، در حالیکه آنتی CD3 سبب لیز سلول‌های T توسط کمپلمان به منظور مهار پاسـخ‌های سلول T می‌گردد. آنتی TNF-α ریسک ابتلا به بیماری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را زیاد می‌کند و آنتی‌ادهزین سـلولی اینتگرین α4 ریسک دوباره فعال شـدن ویروس JC (لکوانسفالوپاتی پیشرونده چندکانونی) را زیاد می‌کند.

نقص‌های ارثی کمپلمان و عفونت میکروبی

نقص‌هـای ارثی **اجـزاء C1q، C1r، C1s، C4** و **C2** کمپلمان با نقص در فعال شـدن مسیر کلاسیک کمپلمان

جدول ۸-۷. نقص‌های ایمنی لنفوسیت‌ها

وضعیت	تعداد سلول T	عملکرد سلول T	تعداد سلول B	آنتی‌بادی‌های سرم	فراوانی
XLA، سندروم بروتون	√	√	↓↓	↓	نادر
نقص RAG1 , RAG2	↓↓	↓↓	↓↓	خیر	نادر
X-SCID	↓↓	↓	√	↓	نادر
XLP، سندروم دانکن	√	↓	√	√ یا ↓	نادر
X-hyper IgM (جهش در CD40 یا CD40L)	√	↓	√	↑↑IgM، اما IgE ،IgG یا IgA وجود ندارند.	نادر
سندروم ویسکات آلدریچ	√	↓	√	↓IgM ،↑IgE ،↑IgA ↓	نادر
SCID: نقص ADA یا PNP	↓↓	↓↓	↓	↓	بسیار نادر
نقص HLA	↓	↓	√	پاسخ آنتی‌ژنی ضعیف	بسیار نادر
آتاکسی تلانژکتازی	↓	↓	√	IgG2↓، IgE↓، IgA↓	غیر شایع
سندروم دی جورج	↓↓	↓	√	IgG↓، IgE↓، IgA↓	بسیار نادر
نقص IgA	√	√	√	↓IgA	شایع

ADA: آدنوزین دآمیناز، Ag: آنتی‌ژن، HLA: آنتی‌ژن لوکوسیتی انسان، Ig: ایمونوگلوبولین، PNP: پورین نوکلئوزید فسفوریلاز، RAG: ژن فعال‌کننده نوترکیبی، XLA: آگاماگلوبونیمی وابسته به X، XLP: لنفوپرولیفریتیو وابسته به X (سندروم)، X-SCID: بیماری نقص ایمنی مرکب شدید وابسته به X، √= نرمال، ↑= افزایش یافته، ↓= کاهش یافته یا نقص.
فراوانی تقریبی: بسیار نادر= $<۱۰^{-۶}$، نادر= $۱۰^{-۵}$ تا $۱۰^{-۶}$، شایع= $۱۰^{-۲}$ تا $۱۰^{-۳}$.

همراه است که منجر به حساسیت بیشتر فرد در برابر عفونت‌های چرکزا (تولید کننده چرک) استافیلوکوکوسی و استرپتوکوکوسی می‌شود (شکل ۱۳-۷). این باکتری‌ها توسط سلول‌های γ/δT کنترل نمی‌شوند. **نقص C3** منجر به ایجاد اختلال در فعالیت هر دو مسیرهای کلاسیک و آلترناتیو کمپلمان می‌شود که در نتیجه آن شیوع عفونت‌های چرکزا بالاتر می‌رود. **نقص فاکتورهای پروپردین** فعال شدن مسیر آلترناتیو کمپلمان را معیوب می‌سازد که در نتیجه آن حساسیت به عفونت‌های چرک زا افزایش می‌یابد. سرانجام، **نقص‌هایی در C5 تا C9** با نقص در کشتار سلولی مرتبط می‌باشند که حساسیت به عفونت‌های منتشره توسط گونه‌های *نایسریا* را افزایش می‌دهد.

نقص‌ها در عملکرد فاگوسیت

افرادی که دارای نقص در فاگوسیت‌ها می‌باشند حساسیت بیشتری نسبت به عفونت‌های باکتریایی دارند نه عفونت‌های ویروسی و پروتوزآیی (شکل ۱۴-۷). ارتباط بالینی مکانیسم کشتار واسطه به اکسیژن به وسیله **بیماری گرانوماتوز مزمن** در کودکانی که فاقد آنزیم‌هایی (مانند NADPH اکسیداز)، برای تولید آنیون سوپراکسید، هستند نشان داده شده است. گرچه فاگوسیتوز در این کودکان طبیعی می‌باشد ولی این کودکان قادر به اکسید کردن NADPH نیستند و نمی‌توانند باکتری‌ها را از مسیر اکسیداتیو تخریب کنند. در بیماران مبتلا به **سندرم چیدیاک هیگاشی** گرانول‌های نوتروفیلی زمانی که این سلول‌ها در مغز استخوان نابالغ هستند به هم متصل می‌شوند. از اینرو نوتروفیل‌های این بیماران می‌توانند باکتری‌ها را فاگوسیتوز نمایند اما توانایی در کشتن آن‌ها بسیار کاهش یافته است. قادر به کشتن آن‌ها نیستند. جهت کنترل عفونت، اطراف فاگوسیت آلوده، گرانولوماها تشکیل می‌شوند. افراد فاقد طحال **(Asplenic Individuals)** در معرض خطر عفونت با ارگانیسم‌های کپسول دار هستند زیرا که این افراد

سؤال‌ها

۱. نوع پاسـخ ایمنی که در انواع مختلف واکسن‌های زیر ایجاد می‌شود را شـرح دهید. مسیر پردازش و عرضه آنتی‌ژن‌های و نوع سـلول و سایتوکاین‌های درگیر در هر پاسخ را توصیف کنید.

الف) توکسوئید کزاز: تزریق داخل عضلانی فیکس شده با فرمالین، پروتئین سم کزاز غیر فعال با حرارت.

ب) واکسن پولیو غیر فعال شده: تزریق داخل عضلانی پولیو ویروس غیر فعال شـده با مواد شیمیایی که قادر به همانندسازی نیست.

ج) واکسن سـرخک زنده ضعیف شـده: تزریق داخل عضلانی ویروس که در سـلول‌ها تکثیر می‌یابد و آنتی‌ژن را در سـلول‌ها و روی سـطح سلول بیان می‌کند.

۲. ستون‌های مربوطه را پر کنید.

بیماری نقص ایمنی	اختلال ایمنی	حساسیت به عفونت‌های خاص
سندرم چیدیاک هیگاشی		
بیماری گرانولوماتوز مزمن		
نقص C5 کمپلمان		
نقص C3 کمپلمان		
نقص C1 کمپلمان		
نقـص C6، C7، C8 یا و C9 کمپلمان		
نقص در IgA		
آگاماگلو بینمی وابسته به X		
نقص سلول T وابسته به X		
AIDS		
سندرم دی جورج		

مکانیسـم پالایش ماکروفاژهای طحال را از دست داده‌اند. سایر نواقص در شکل (۱۴-۷) نشان داده شده است.

نقص‌های موجود در پاسخ‌های ایمنی اختصاصی آنتی‌ژن

افرادی که دارای نقص در **عملکرد سـلول T** هسـتند بـه **عفونت‌های فرصت‌طلب** ناشـی از (۱) ویروس‌ها به ویـژه ویروس‌های پوشـش‌دار و غیر سـایتولیتیک و عود ویروس‌هایـی کـه مولد عفونت‌هـای نهفته می‌باشـند، (۲) باکتری‌هـای داخل سـلولی، (۳) قارچ‌ها، و (۴) برخی انگل‌ها، حساس می‌باشند. نقص‌های سلول‌های T می‌تواند مانع از بلوغ پاسخ‌های آنتی‌بادی سلول‌های B نیز گردد. نقص‌هـای سـلول T می‌توانند ناشـی از ناهنجاری‌های ژنتیکی (مانند سـندرم نقص سیسـتم ایمنی وابسـته به کروموزوم X، بیماری دانکن (Duncan Disease)، سـندرم دی جـرج (DiGeorge Syndrome) (جدول ۸-۷)، عفونت (مانند HIV و AIDS)، شـیمی درمانی سـرطان یا درمان سرکوب کننده ایمنی برای پیوند بافتی باشند.

در نوزادان پاسـخ سـلول T ناقص است امّا به وسیله IgG مادری تکمیل می‌شود. پاسخ‌های ناقص TH1 و نقص در اینترفرون گاما آنها را در خطر بالای عفونت‌های ناشـی از هرپـس ویروس‌ها قرار می‌دهد. همینطـور، بروز کمتر پاسـخ‌های التهابی و ایمنی سلولی در بچه‌ها شدت عفونت ناشی از هرپس (در مقایسه با بزرگسالان) (مثلاً مونوکلئوز عفونـی، آبله مرغان) و هپاتیت B را کاهش می‌دهد، امّا به دلیل عدم بهبودی کامل، سبب افزایش بالقوه بروز عفونت مزمـن ویروس هپاتیت B می‌شـود. در حاملگی نیز نوعی سـرکوب ایمنی کنترل شـده برای جلوگیری از رد جنین (به عنوان یک بافت خارجی) وجود دارد.

نقص‌های سلول B (B- Cell deficiencies) ممکن است به صورت تولید ناقص آنتی‌بـادی (هایپوگاماگلوبولینمی)، ناتوانی تغییـر کلاس‌های آنتی‌بادی یا ناتوانی در تولید زیر کلاس‌های اختصاصی آنتی‌بادی بروز نماید. افراد مبتلا به نقص در تولیـد آنتی‌بادی در برابر **عفونت‌هـای باکتریایی** بسیار حساس هسـتند. **نقـص IgA** که به نسبت ۱ به ۷۰۰ در میان سفیدپوستان رخ می‌دهد سبب حساسیت بیشتر به **عفونت‌های تنفسی** می‌گردد.

پاسخ‌ها

۱. a. یک پاسخ TH2 که اغلب باعث تولید آنتی‌بادی می‌شود در مقابل پروتئین توکسین تتانوس تولید می‌شود. لنف‌ها آنتی‌ژن را به غدد لنفاوی می‌آورند که در آن‌جا سلول‌های دندریتیک آنتی‌ژن را به سلول‌های TCD4 عرضه می‌کنند. سلول‌های T، IL-4، IL-5، IL-6 و IL-10 را تولید می‌کنند و باعث افزایش تولید آنتی‌بادی‌های مرتبط با TH2 می‌شوند. خاطره کافی نخواهد بود و یادآورها نیاز هستند. آنتی‌بادی که تولید می‌شود توکسین را خنثی خواهد کرد تا از بیماری جلوگیری کند.

b. واکسن غیرفعال پولیو پاسخ مشابه توکسوئید تتانوس ایجاد می‌کنند. آنتی‌بادی موجود در خون از گسترش پولیو به سلول‌های هدف و بیماری شدید جلوگیری می‌کند. ایمنی تحریک‌شده توسط واکسن از عفونت نمی‌تواند جلوگیری کند و از اینرو نمی‌تواند از گسترش ویروس در جمعیت جلوگیری نماید، از اینرو تیپ وحشی پولیو در اغلب نقاط جهان حذف شده است.

c. ویروس سرخک تولید پاسخ‌های IFN-α را تحریک می‌کند که به تبع آن NK و NKT که فعال می‌شوند که این سلول‌ها نیز مقدار کمی IFN-α را تولید می‌کنند. سلول‌های دندریتیک فعال می‌شوند و آنتی‌ژن‌ها را به سلول‌های TCD4 و TCD8 عرضه می‌کنند و همچنین IL-12 نیز تولید می‌کنند که آن نیز باعث تولید IFN-γ بیشتری توسط سلول‌های TCD4 می‌شوند. تولید IL-2 توسط سلول‌های TCD4 باعث افزایش رشد سلول‌های B و T از جمله سلول‌های TCD8 می‌شود. IFN-γ همچنین باعث تغییر کلاس آنتی‌بادی از IgM به IgG می‌شود. بعد از آن، پاسخ ایمنی شامل پاسخ TH2 همراه با بلوغ پاسخ IgG می‌شود. سلول‌های خاطره‌ای طولانی‌مدت نیز تولید خواهند شد. پاسخ ایمنی عفونت، بیماری و گسترش ویروس را مهار خواهد کرد. واکسن پس از سن ۱ سالگی نیز باید تجویز شود و ایمن‌سازی یادآور قبل از سال‌های دبیرستان نیز لازم است.

بیماری نقص ایمنی	اختلال ایمنی	حساسیت به عفونت‌های خاص
سندرم چدیاک هیگاشی	نقص آزادسازی محتویات لیزوزوم‌ها به درون فاگوزوم‌ها، تأخیر کشته شدن باکتری‌های فاگوسیته‌شده	عفونت‌های چرکزا (استافیلوکوکوسی و استرپتوکوکوسی)
بیماری گرانولوماتوز مزمن	ناتوانی در تولید پراکسید هیدروژن برای کشتن باکتری‌های فاگوسیته شده	عفونت‌های عودیابنده با باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ویژه استافیلوکوکوس اورئوس و پسودوموناس ائروژینوزا
نقص C5 کمپلمان	کاهش کموتاکسی و از بین رفتن باکتری‌ها	عفونت‌های باکتریایی
نقص C3 کمپلمان	جلوگیری از آبشار کمپلمان. C3 در هر دو مسیر اصلی و فرعی کمپلمان یک عنصر مرکزی است.	عفونت استافیلوکوکوسی، استرپتوکوکوسی و سایر باکتری‌های گرم مثبت
نقص C1 کمپلمان	جلوگیری از مسیر کلاسیک کمپلمان	عفونت‌های باکتریایی
نقص در C6، C7، C8 و یا C9	ناتوانی در حمله غشایی	غفونت‌های نایسریایی
نقص در IgA	نقص در سلول‌های B، تولید ناکافی سیتوکین‌ها، جهش در زنجیره J یا زنجیره ترشحی	عفونت‌های تنفسی و روده‌ای
آگاماگلوبینی وابسته به X	نقص CD40، نقص بلوغ سلول‌های Pre-B	عفونت‌های باکتریایی و سایر عفونت‌ها. نمی‌توانند تغییر کلاس آنتی‌بادی را تحمل کنند.

پاسخ‌ها

بیماری نقص ایمنی	اختلال ایمنی	حساسیت به عفونت‌های خاص
نقص سلول T وابسته به X	نقص رسپتورهای مشترک IL-4, IL-7, IL-2 IL-9 , IL-15 یا سیگنال‌های رسپتور	باکتری‌های درون سلولی، عفونت‌های ویروسی (به ویژه هرپس و JC) و قارچی. نمی‌توانند تغییر کلاس آنتی‌بادی را تحمل کنند.
AIDS	سلول‌های TCD4 توسط HIV کشته می‌شوند.	باکتری‌های درون سلولی. ویروسی (به ویژه JC و هرپس) قارچ‌ها و انگل‌ها
سندرم دی‌جرج	بلوغ سلول‌های T	باکتری‌های درون سلولی. ویروس‌ها (به ویژه JC و هرپس) قارچ‌ها و انگل‌ها. نمی‌توانند تغییر کلاس آنتی‌بادی را تحمل کنند.

فصل ۸ واکسن‌های ضد میکروبی

ایمنی، چه در واکنش به عفونت ایجاد شده باشد یا ایمن‌سازی یا به عنوان یک درمان تجویز شده، می‌تواند موجب کاهش یا جلوگیری از بروز علایم شدید بیماری شود. پاسخ‌های ایمنی خاطره‌ای فعال شده در نتیجه تهدید در فرد مصون شده با سرعت و قدرت بیشتری علیه عامل عفونی نسبت به فرد غیرمصون فعال می‌شوند. ایمونیزاسیون یک جمعیت، همانند مصون سازی فردی، از پخش عامل عفونی از طریق کاهش تعداد میزبان‌های حساس **(ایمنی گروهی (Herd Immunity))** ممانعت می‌کند. برنامه‌های ایمونیزاسیون در سطوح ملی و بین‌المللی اهداف زیر را دنبال می‌کنند:

(۱) حفاظت گروه‌های جمعیتی در برابر علائم سیاه سرفه، دیفتری، کزاز و هاری.

(۲) حفاظت و کنترل انتشار سرخک، اوریون، سرخجه، آبله مرغان، آنفلوآنزا، روتاویروس، **هموفیلوس آنفولانزا تیپ** B (Hib).

(۳) حذف سوش وحشی پولیومیلیت در اغلب کشورهای جهان و آبله در تمام جهان.

(۴) کاهش خطر سرطان ناشی از پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) خطر بالا یا عفونت‌های ویروس هپاتیت B (HBV) مزمن.

با پیوستگی برنامه‌های ایمونیزاسیون، اقدامات پیشگیری از بیماری می‌تواند به وسیله محدود کردن برخورد افراد سالم با افراد آلوده **(قرنطینه)** و از طریق حذف منبع (مثلاً تصفیه آب آشامیدنی) یا روش‌های گسترش (مثلاً از بین بردن پشه‌ها) عامل عفونی امکان‌پذیر گردد. از سال ۱۹۷۷، آبله طبیعی به طور موفقیت آمیز با استفاده از برنامه منسجم واکسیناسیون و قرنطینه به وسیله سازمان بهداشت جهانی (WHO) ریشه کن شده است. پولیو و سرخک نیز مورد هدف ریشه‌کنی بوده‌اند.

هنوز بیماری‌های قابل پیشگیری توسط واکسن در جاهایی که برنامه‌های ایمن‌سازی در دسترس نبوده یا بسیار گران می‌باشند (کشورهای در حال توسعه) یا اطلاعات غلط وجود دارد یا اعتقادات شخصی یا بی‌توجهی مانع استفاده از واکسن می‌گردد، هنوز رخ می‌دهد. برای مثال شیوع سرخک که سالانه سبب مرگ ۲ میلیون نفر در سراسر جهان می‌شود وقوع آن به همه این دلایل در ایالات متحده و اروپا ادامه پیدا کرده است. بحث راجع به هر یک از واکسن‌ها با بیماری که از آن پیشگیری می‌کنند در فصل‌های بعدی ارائه شده است.

انواع ایمونیزاسیون

تزریق آنتی‌بادی خالص شده یا سرم حاوی آنتی‌بادی که حفاظت سریع و موقتی یا درمان یک فرد را سبب می‌شود تحت عنوان **ایمنی غیر فعال (Passive Immunization)** نامیده می‌شود. نوزادان، ایمنی غیر فعال طبیعی را از ایمونوگلوبولین مادرشان که از جفت می‌گذرد و یا در شیر مادر حضور دارد، دریافت می‌کنند. آنتی‌بادی‌ها درمانی که پاسخ‌های خودایمنی و سلول T شخصی‌شده را بلوکه می‌کنند یا درمان ضدتومور سلول دندرتیک (DC) نیز اشکالی از ایمنی فعال هستند.

ایمنی فعال (Active Immuniaztion) زمانی که پاسخ ایمنی در مقابله با یک ایمونوژن از قبیل برخورد با یک عامل عفونی **(ایمنی ذاتی (Natural Immunization))** یا از طریق برخورد با میکروب‌ها یا آنتی‌ژن‌های آن‌ها در واکسن‌ها تحریک می‌شود، به وجود می‌آید. در درگیری بعدی با عامل بیماریزا پاسخ ایمنی ثانویه که سریع‌تر و کارآمدتر در محافظت فرد می‌باشد فعال می‌شود و یا آنتی‌بادی برای ممانعت از انتشار یا بیماریزایی عامل به وجود می‌آید.

ایمونیزاسیون غیر فعال

ایمنی سازی غیر فعال ممکن است در موارد زیر به کار برده شود:

(۱) برای پیشگیری از بیماری پس از یک تماس شناخته شده (مثلاً پس از صدمه با سوزن خونی آلوده به ویروس هپاتیت B [HBV]).

(۲) برای بهبودی علایم بیماری در حال پیشرفت.

(۳) برای حفاظت بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی.

(۴) برای مهار عملکرد سموم باکتریایی یا زهرها و ممانعت از بیماری که توسط آن‌ها ایجاد می‌شود (یعنی به عنوان درمان).

ایمونوگلوبولین سرم تهیه شده از انسان‌ها یا حیوانات (مثلاً اسب‌ها) مثبت از نظر سرولوژیکی (seropositive) بعنوان پروفیلاکسی برای چندین بیماری ویروسی و باکتریایی در دسترس می‌باشد (جدول ۱-۸). ایمونوگلوبولین سرمی انسان از منبع پلاسما بدست می‌آید و حاوی مجموعه‌ای از آنتی‌بادی‌های طبیعی برای یک فرد بالغ است. فرآورده‌های ایمونوگلوبولین اختصاصی با تیتر بالا برای ویروس هپاتیت B (HBIg)، ویروس واریسلا-زوستر (VZIg)، ویروس هاری (RIg) و باکتری کزاز (TIg) در دسترس است. ایمونوگلوبولین انسانی به دلیل آنکه واکنش ازدیاد حساسیت کمتری (بیماری سرم) ایجاد می‌کند نسبت به ایمونوگلوبولین حیوانی ارجح‌تر است.

جدول ۱-۸. ایمونوگلوبولین‌های در دسترس برای پیشگیری بعد از مواجهه*

بیماری	منبع
هپاتیت A	انسان
هپاتیت B	انسان
سرخک	انسان
هاری	انسان⁺
آبله مرغان، واریسلا زوستر	انسان⁺
سایتومگالوویروس	انسان
کزاز	انسان⁺، اسب
بوتولیسم	اسب
دیفتری	اسب
ویروس سین سی شیال تنفسی	مونوکلونال

*ایمونوگلوبولین مربوط به سایر عوامل نیز ممکن است در دسترس باشد.

⁺ آنتی‌بادی اختصاصی با تیتر بالا در دسترس است و ترجیحاً برای درمان به کار می‌رود.

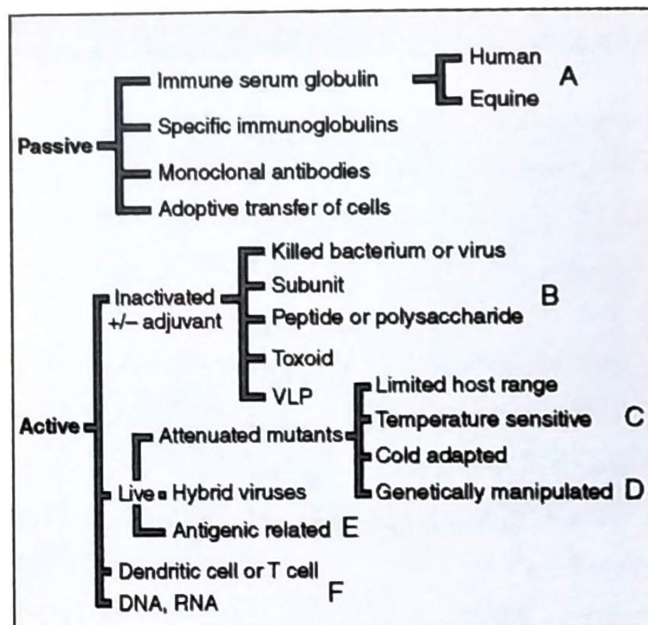
فرآورده‌های آنتی‌بادی مونوکلونال جهت حفاظت در مقابل عوامل و بیماری‌های مختلف گسترش یافته‌اند. بسیاری از این آنتی‌بادی‌ها بصورت ژنتیکی از ژن‌های ایمونوگلوبولین انسانی مهندسی یا انسانیزه شده‌اند تا واکنش‌های رد آنتی‌بادی به حداقل برسد. علاوه بر بیماری‌های عفونی، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بعنوان درمان برای ممانعت از پاسخ‌های سایتوکینی بیش از اندازه و پاسخ‌های سلولی در بیماری‌های خودایمنی، تحریک پاسخ‌های ضد توموری و برای سایر درمان‌ها استفاده می‌شوند.

ایمونیزاسیون فعال

اصطلاح واکسن (Vaccine) از ویروس واکسینیا (Vaccinia Virus) گرفته شده است که عضوی از خانواده پاکس ویروس‌ها با ویرولانس اندک بوده و جهت ایمونیزاسیون مردم علیه آبله به کار رفته است. واکسن‌های کلاسیک می‌توانند براساس ایجاد پاسخ ایمنی در برابر عفونت (**واکسن‌های زنده** همچون واکسینیا) و یا نبودن هیچ‌گونه پاسخ ایمنی (**واکسن‌های غیر فعال شده-زیر واحدی-کشته شده (Inactivated-subunit-killed Vaccines)**) به دو گروه تقسیم شوند (شکل ۱-۸). واکسن‌های داکسی ریبونوکلئیک اسید (**Deoxyribonucleic Acid (DNA) Vaccines**) یکی از روش‌های جدید ایمونیزاسیون می‌باشند که عفونت را شبیه سازی می‌کنند. پاسخ‌های ایمنی نسبت به پروتئین میکروبی یا سایر پروتئین‌های کد شده تحریک می‌شود (بعداً شرح داده می‌شود).

واکسن‌های غیر فعال شده (Inactivated Vaccines)

در واکسن‌های غیر فعال شده از مقدار زیادی آنتی‌ژن استفاده می‌نمایند تا بتوانند پاسخ محافظتی آنتی‌بادی را بدون خطر ایجاد عفونت به وسیله عامل، ایجاد کنند. واکسن‌های غیر فعال به وسیله غیر فعال نمودن شیمیایی (مثلاً فرمالین) یا غیر فعال کردن حرارتی باکتری‌ها، توکسین‌های باکتریایی



شکل ۱-۸. انواع ایمنی. آنتی‌بادی‌ها (ایمنی غیر فعال) می‌توانند برای ممانعت از عملکرد عوامل عفونی به کار روند یا پاسخ ایمنی (ایمنی فعال) می‌تواند توسط عفونت طبیعی یا واکسیناسیون به وجود آید. شکل‌های مختلف ایمنی فعال و غیر فعال وجود دارد. A، اگر آنتی‌بادی انسانی در دسترس نباشد آنتی‌بادی‌های اسبی می‌توانند به کار روند. B، واکسن می‌تواند از اجزاء خالص شده عوامل عفونی تشکیل شده باشد و یا از طریق مهندسی ژنتیکی (Vitus-like Protein [VLP]) ساخته شود. C، واکسن از طریق پاساژ در حیوانات، تخم مرغ‌های جنین‌دار یا سلول‌های کشت بافتی قابل تولید است. D، حذف، اضافه، بازآرایی و سایر موتانت‌های مشتق از آزمایشگاه E، واکسن از گونه‌های مختلف یک ویروس تشکیل شده که دارای آنتی‌ژن مشترک با ویروس انسانی است. F، دستاوردهای جدیدتر و تجربی واکسن. RNA، ریبونوکلئیک اسید.

یا ویروس‌ها و یا به وسیله خالص کردن یا سنتز ترکیبات یا زیر واحدهای عوامل عفونی بدست می‌آیند. واکسن‌های غیرفعال معمولاً پاسخ‌های آنتی‌بادی (پاسخ‌های TH2) و پاسخ ایمنی وابسته به سلول محدوده شده را ایجاد می‌کنند.

این واکسن‌ها معمولاً با یک **ادجوانت (Adjuvant)** که باعث تقویت ایمنی‌زایی از طریق افزایش برداشت یا تحریک سلول‌های دندریتیک (DCs) و ماکروفاژها می‌شود، تجویز می‌شوند. **آلوم** (هیدروکسید آلومینیوم یا فسفات آلومینیوم) متداول‌ترین آدجوانت و تأییدشده می‌باشد. بسیاری از واکسن‌های پروتئینی بر روی آلوم (Alum) رسوب داده می‌شوند تا سبب رهایی آهسته آنتی‌ژن و جذب توسط دندریتیک سل‌ها (DCs) و ماکروفاژها شوند. سایر ادجوانت‌ها ممکن است گیرنده‌های شبه Toll را تحریک نموده یا اینفلامازوم را در این سلول‌های ارائه‌کننده آنتی‌ژن فعال کنند تا پاسخ‌هایی را که شباهت بیشتری به ایمونیزاسیون طبیعی دارند تحریک نمایند. ادجوانت‌های تجربی شامل امولیسیون‌ها، ذرات شبیه ویروس (Virus-like Particles)، لیپوزوم‌ها (Liposomes) (به کمپلکس‌های لیپیدی معروف هستند)، اجزاء دیواره سلولی باکتریایی، قفس‌های ملکولی برای آنتی‌ژن و سورفکتانت‌های پلیمریک و شکل‌های ضعیف شده سم کلرا (Cholera Toxin) و لنفوتوکسین اشریشیاکلی (*Escherichi coli Lymphotoxin*) می‌باشند. شکل‌های ضعیف شده سم کلرا و لنفوتوکسین اشریشیاکلی ادجونت‌های قوی برای آنتی‌بادی ترشحی (ایمونوگلوبولین A) پس از ایمونیزاسیون از طریق دهان یا داخل بینی هستند. MF59 (میکروفلوئید اسکوالن (Squalene Microfluidized) در امولسیون آب و چربی) در واکسن آنفلوآنزا $AS01_b$ و Fluad و مونوفسفوریل لیپید A (Monophosphoryl Lipid A (MPL)) مخلوط با ساپونین در لیپوزوم برای واکسن زوستر Shingrix استفاده می‌شوند. استفاده از ادجوانت پاسخ‌های وابسته به سلول را تحریک کرده و امکان کاهش در میزان آنتی‌ژن موردنیاز برای تحریک ایمنی حفاظتی را فراهم می‌سازد.

واکسن‌های غیر فعال شده بیشتر از واکسن‌های زنده برای ایجاد حفاظت در برابر اکثر باکتری‌ها و ویروس‌هایی که نمی‌توانند ضعیف شوند و یا ممکن است عفونت عود کننده ایجاد کنند و یا بالقوه سرطانزا هستند، به کار می‌روند. واکسن‌های غیر فعال معمولاً بی‌خطر هستند به استثنای افرادی که در برابر اجزای واکسن دچار واکنش‌های آلرژیک می‌شوند. معایب واکسن‌های غیر فعال شده در ادامه آمده است و با واکسن‌های زنده در جدول ۲-۸ مقایسه شده‌اند.

(۱) ایمنی معمولاً مادام العمر نیست.

(۲) ایمنی ممکن است فقط هومورال (TH2) باشد نه وابسته به سلول.

(۳) واکسن موجب برانگیختن پاسخ IgA موضعی نمی‌شود.

(۴) دوزهای یادآور لازم است.

(۵) دوزهای بیشتری باید مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۲-۸. مزایا و معایب واکسن‌های زنده در مقابل واکسن‌های غیر فعال شده

ویژگی	زنده	غیر فعال شده
مسیر تجویز	طبیعی یا تزریق*	تزریق
دوز ویروس	پایین	بالا
تعداد دوزها، میزان	تک دوز، پایین†	چندگانه، بالا
نیاز به ادجوانت	خیر	بله‡
مدت مصونیت	طولانی مدت	کوتاه مدت
پاسخ آنتی‌بادی	IgG ، IgA§	IgG، IgM
پاسخ ایمنی وابسته به سلول	خوب	ضعیف
پتانسیل پایداری	بله	پایدارتر
اثرات جانبی¶	گاهی علائم ملایم	گاهی بروز راش روی بازو
بازگشت ویرولانس	به ندرت	خیر

Ig: ایمونوگلوبولین

* خوراکی یا تنفسی در مواقع خاص.

† ممکن است یک یادآور پس از ۱۰-۶ سال لازم باشد (تب زرد، سرخک، سرخجه).

‡ IgA از طریق مسیر تنفسی یا خوراکی استعمال می‌شود.

سه نوع عمده واکسن‌های غیر فعال باکتریایی وجود دارد: **توکسوئید (Toxoid)** (توکسین‌های غیر فعال شده)، **باکتری‌های غیر فعال (کشته شده) (Inactivated (Killed))** و ترکیبات سطحی باکتری‌ها از قبیل **زیر واحدهای پروتئین یا کپسول (Capsule or Protein Subunits)**. واکسن‌های باکتریایی که هم اکنون در دسترس می‌باشند در جدول (۳-۸) فهرست شده‌اند. اکثر واکسن‌های ضد باکتریایی، بدن را در برابر فعالیت پاتوژنیک توکسین‌ها محافظت می‌کنند.

از میان سایر ویروس‌ها، واکسن‌های ویروسی غیر فعال شده برای **پولیو، هپاتیت A، آنفولانزا و هاری** در دسترس هستند. **واکسن پولیو سالک (واکسن پولیومیلیت غیر فعال شده یا [IPV])** از طریق غیر فعال کردن ویریون‌ها به وسیله فرمالدهید (Formaldehyde) تهیه می‌شود. واکسن هاری از طریق غیر فعال کردن شیمیایی ویریون‌هایی که در سلول‌های کشت بافت دیپلوئید انسان رشد کرده‌اند، بدست می‌آید. به علت سیر آهسته هاری، واکسن را می‌توان فوراً پس از آنکه فرد در معرض ویروس هاری قرار گرفت، تجویز کرد تا پاسخ آنتی‌بادی محافظتی ایجاد شود.

واکسن زیر واحدی (Subunit Vaccine) از اجزای باکتریایی یا ویروسی تشکیل شده که پاسخ ایمنی محافظتی را ایجاد می‌کند. ساختارهای سطحی باکتری‌ها و پروتئین‌های اتصالی ویروسی (کپسید یا گلیکوپروتئین‌ها) آنتی‌بادی‌های محافظتی ایجاد می‌کنند. همچنین آنتی‌ژن‌های سلول T ممکن است در واکسن زیر واحدی مورد استفاده قرار گیرند. ترکیب ایمونوژن می‌تواند از باکتری، ویروس یا سلول‌های مبتلا به ویروس به وسیله روش‌های بیوشیمیایی یا از طریق مهندس ژنتیک با بیان ژن‌های ویروسی کلون شده در باکتری یا سلول‌های یوکاریوت تهیه شود. برای مثال واکسن زیر واحد هپاتیت B در ابتدا از آنتی‌ژن سطحی تهیه شده از سرم انسانی ناقلین مزمن ویروس تهیه شده است. امروزه واکسن هپاتیت B از مخمری که ژن HBsAg در آن تکثیر می‌یابد، خالص می‌شود. آنتی‌ژن خالص شده، تیمار شده با روش شیمیایی و جذب شده روی آلوم (Alum) بعنوان واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروتئین‌های زیر واحدی که در واکسن HBV استفاده می‌شوند و واکسن‌های پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) **از ذرات شبه ویروس (VLPs)** تهیه می‌گردند بیشتر از پروتئین‌های تکی ایمونوژنیک هستند. همینطور واکسنی که از عود مجدد ویروس واریسلا زوستر (VZV) (Shingles) جلوگیری می‌کند از گلیکوپروتئین E ویروس VZV فرموله شده بصورت لیپوزوم و ادجوانت شده با AS101 تشکیل شده است.

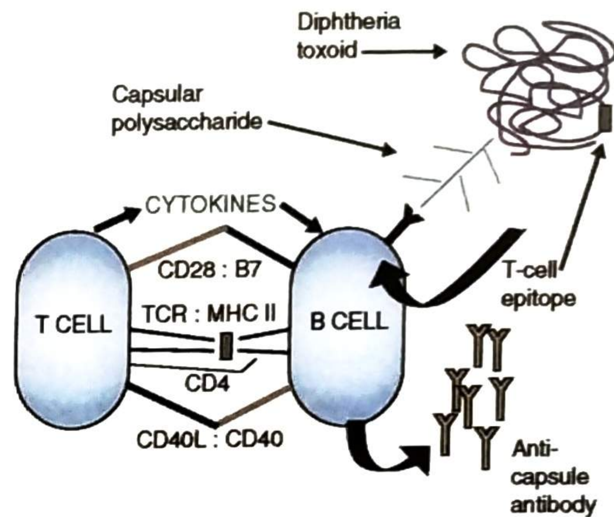
جدول ۳-۸. *واکسن‌های باکتریایی

باکتری (بیماری)	ترکیبات واکسن	چه کسانی باید واکسن‌ها را دریافت کنند
کورینه باکتریوم دیفتریه (دیفتری)	توکسوئید	بچه‌ها و بزرگسالان
کلستریدیوم تتانی (کزاز)	توکسوئید	بچه‌ها و بزرگسالان
بوردتلا پرتوسیس (سیاه سرفه)	فاقد سلول (Acellular)	بچه‌ها و نوجوانان
هموفیلوس آنفولاآنزا B (Hib)	کپسول پلی ساکاریدی کنژوگه‌شده با پروتئین	بچه ها
نایسریا منتژیتیدیس A، C، Y، W135 (بیماری مننگوککی)، نایسریا منتژیتیدیس B	کپسول پلی‌ساکاریدی، کپسول پلی‌ساکاریدی کنژوگه‌شده با پروتئین، پروتئین‌های غشاء خارجی	افراد در خطر بالا (مانند افراد فاقد طحال)، افراد مسافرت کننده به مناطق اندمیک (مانند پرسنل نظامی)، بچه ها
استرپتوکوکوس پنومونیه (بیماری پنوموکوکی و مننژیت)	کپسول پلی ساکاریدی، کپسول پلی‌ساکاریدی کنژوگه‌شده با پروتئین	افراد در خطر بالا (مانند افراد فاقد طحال)، بچه ها، افراد مسن
ویبربو کلرا (وبا)	سلول کشته شده (Killed Cell)	مسافرینی که در خطر مواجهه قرار دارند.
سالمونلا تایفی (تایفوئید)	سلول کشته شده، پلی ساکارید	مسافرینی که در خطر مواجهه قرار دارند، تماس‌های خانوادگی، کارگران فاضلاب
باسیلوس آنتراسیس (سیاه زخم)	سلول کشته شده	کسانی که با پشم و مو وارداتی سر و کار دارند، پرسنل نظامی
یرسینیا پستیس (طاعون)	سلول کشته شده	دامپزشکان و کسانی که با حیوانات سر و کار دارند.
فرانسیسلا تولارنسیس (تولارمی)	زنده تخفیف حدت یافته	کسانی که با حیوانات در مناطق اندمیک سر و کار دارند.
کوکسیلا بورنتی (تب Q)	غیرفعال شده (Inactivated)	پرسنل آزمایشگاه که با کوکسیلا بورنتی کار می‌کنند، کسانی که با گوسفندان سر و کار دارند.
مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس (توبرکلوزیس)	باسیل زنده ضعیف شده کالمت-گرین مایکوباکتریوم بوویس	در ایالات متحده توصیه نمی‌شود.

*با توجه به فراوانی کاربرد لیست شده‌اند.

اغلب واکسن‌های سالانه آنفولانزا غیر فعال شده از مخلوطی از پروتئین‌های هماگلوتنین و نورآمینیداز تهیه شده از تخم مرغ‌های جنین‌دار یا سلول‌های کشت بافت آلوده شده با سویه‌های مختلف آنفلوآنزا A و B یا از پروتئین مهندسی‌شده به صورت ژنتیکی تشکیل شده‌اند. ترکیب واکسن سالانه فرمول بندی می‌شود تا در برابر سویه‌های ویروس آنفولانزا که پیش بینی می‌شود در سال آینده تهدیدی برای جمعیت به شمار آیند، حفاظت ایجاد کند.

واکسن‌های علیه **هموفیلوس آنفولانزای B (Haemophilus influenza B)**، **نایسریا منتژیتیدیس (Neisseria meningitidis)**، سالمونلا تیفی (*Salmonella Typhi*) و استرپتوکوکوس پنومونیه (۲۳ سویه) از پلی ساکاریدهای کپسولی (Capsular Polysaccharides) تهیه می‌شوند. متأسفانه پلی ساکاریدها معمولاً ایمونوژن‌های ضعیفی هستند (آنتی‌ژن‌های مستقل از سلول T می‌باشند). واکسن مننگوکوکی از چهار سروتیپ اصلی پلی ساکاریدی (A، C، Y و W135) تشکیل شده است. واکسن پنوموکوکی حاوی پلی‌ساکاریدها از ۲۳ سروتیپ می‌باشد. قدرت ایمنی‌زایی پلی‌ساکاریدها را می‌توان از طریق اتصال شیمیایی آن به یک پروتئین ناقل (**واکسن کونژوگه** (Conjugate Vaccine)) افزایش داد (به عنوان مثال: توکسوئید دیفتری، پروتئین غشاء خارجی نایسریا منتژیتیدیس یا پروتئین کورینه باکتریوم دیفتری) (شکل ۲-۸). کمپلکس پلی‌ساکارید هموفیلوس آنفولانزا B (Hib)-ناقل توکسوئید دیفتری



شکل ۲-۸. واکسن‌های کنژوگه پلی ساکارید کپسولی. پلی ساکاریدهای کپسولی ایمونوژن‌های ضعیفی هستند و سلول T کمکی را تحریک نمی‌کنند و تنها IgM بدون خاطره را تحریک می‌کنند. کپسول پلی ساکاریدی کونژوگه شده به یک پروتئین (مثلا توکسوئید دیفتری) به IgM ضد پلی ساکاریدی سطحی روی سلول B متصل می‌شود که این کمپکس به داخل کشیده شده، پردازش می‌شود و سپس پپتید روی MHC کلاس II به سلول‌های TCD4 عرضه می‌گردد. این سلول‌های T فعال شده و سایتوکین تولید می‌کنند و سبب تغییر کلاس ایمونوگلوبین برای سلول B اختصاصی پلی ساکارید می‌گردند. سلول B می‌تواند فعال شود، IgG تولید کند و سلول‌های خاطره‌ای توسعه خواهند یافت. TCR، گیرنده سلول T.

H. influenza B (Hib) polysaccharide-diphtheria) (Toxoid Carrier Complex برای تجویز در نوزادان و کودکان مورد تأیید قرار گرفته است. یک واکسن **کونژوگه پنوموکوکی** جهت استرپتوکوکوس پنومونیه تهیه شده است که در آن پلی ساکارید ۱۳ مورد از شایع ترین سویه‌ها در ایالات متحده به فرم غیر سمی توکسین دیفتری (Diphtheria Toxin) متصل شده است. این واکسن برای استفاده در نوزادان و کودکان در دسترس می‌باشد. سایر واکسن‌های پلی ساکاریدی کمتر ایمونوژن هستند و باید در افراد بالای ۲ سال استفاده شوند.

واکسن‌های زنده (Live Vaccines)

واکسن‌های زنده با ارگانیسم‌های زنده‌ای که توانایی بیماریزایی آن‌ها محدود شده است (مثلاً ارگانیسم‌های **غیر ویرولانس (Avirulent) یا ضعیف شده (Attenuated))** تهیه می‌شوند. واکسن‌های زنده مخصوصاً برای محافظت علیه عفونت‌های ناشی از ویروس‌های پوشش‌دار که به پاسخ‌های ایمنی سلولی وابسته به T برای از بین بردن عفونت نیاز دارند، مفید است. ایمن سازی با واکسن زنده مشابه عفونت طبیعی است که در آن پاسخ‌های ایمنی از طریق پاسخ‌های ایمنی ذاتی، TH1 و سپس TH2 و پاسخ‌های ایمنی هومورال، سلولار و خاطره‌ای توسعه می‌یابد. مصونیت ایجاد شده معمولاً طولانی مدت و وابسته به مسیر تجویز است و می‌تواند پاسخ ایمنی طبیعی علیه عامل عفونی را تقلید کند. به هر حال، سه مشکل عمده در رابطه با واکسن‌های زنده وجود دارد:

(۱) ویروس موجود در واکسن ممکن است هنوز برای افرادی که ضعف سیستم ایمنی دارند و یا زنان حامله‌ای که حتی برای حذف عفونت ویروس ضعیف شده، منابع ایمونولوژیکی ندارد خطرناک باشد.

(۲) واکسن ممکن است به فرم ویروسی بیماریزا تبدیل شود.

(۳) واکسن باید همواره زنده بماند.

واکسن‌های باکتریایی زنده (Live Bacterial Vaccines) شامل واکسن سویه ضعیف شده سالمونلا تایفی (Ty21a) تجویز شونده از طریق خوراکی برای حصبه (Typhoid)، واکسن باسیل کالمت گرین (BCG)برای توبرکلوزیس (Tuberculosis) که از سویه ضعیف شده مایکو باکتریوم بوویس به دست می‌آید و واکسن ضعیف شده تولارمی (Tularemia) می‌باشند. ترکیب پاسخ‌های ایمنی وابسته به سلول و آنتی‌بادی ایجاد شده به وسیله واکسن زنده ممکن است علیه باکتری‌های رشد کننده به صورت داخل سلولی مفید باشد. واکسن BCG در ایالات متحده استفاده نمی‌شود زیرا افراد واکسینه شده نسبت به تست مشتق پروتئینی خالص شده (Purified Protein Derivative (PPD)) که یک تست غربالی برای کنترل سل در ایالات متحده می‌باشد نوعی واکنش مثبت کاذب نشان می‌دهند.

واکسن‌های ویروسی زنده از موتانت‌هایی با ویرولانس کم **(ضعیف شده (Attenuated))** از ویروس تیپ وحشی، ویروس‌هایی از سایر گونه‌ها که شاخص‌های آنتی‌ژنی مشترکی دارند (واکسینیا برای آبله، روتا ویروس گاوی یا میمون) و یا ویروس‌هایی که از طریق مهندسی ژنتیکی

جدول ۴-۸. واکسن‌های• ویروسی

ویروس	ترکیبات واکسن	چه کسانی باید واکسن را دریافت کنند
پولیو، غیرفعال‌شده	سه‌ظرفیتی (واکسن سالک)	کودکان
پولیو ضعیف‌شده	زنده (واکسن پولیو خوراکی، واکسن سابین).	کودکان، کودکان در نواحی اندمیک
سرخک	ضعیف شده	کودکان
اوریون	ضعیف شده	کودکان
سرخجه	ضعیف شده	کودکان
واریسلا زوستر	ضعیف شده	کودکان
زوستر	دوز بالاتر	بالغین بالاتر از ۶۰ سال
	gpE ادجوانت شده	
روتاویروس	هیبریدهای ضعیف‌شده انسان- گاو	نوزادان
پاپیلوما ویروس انسانی (HPV)	ذره شبه ویروس (VLP)	دختران ۹ تا ۲۶ سال
آنفولاآنزا	غیر فعال شده یا HA نوترکیب	کودکان، بالغین، به ویژه پرسنل پزشکی و افراد مسن بالای ۶۵ سال
	دوز بالا یا ادجوانت شده	
	ضعیف شده (اسپری بینی)	۲ تا ۵۰ سال
هپاتیت B	زیر واحد (VLP)	نوزادان، کارکنان بخش بهداشت، گروه‌های در معرض خطر زیاد (مانند شریک‌های جنسی، استفاده کننده‌های داروهای داخل وریدی)
هپاتیت A	غیر فعال شده	کودکان، کارکنان بخش اطفال، مسافران به نواحی اندمیک، بومیان آمریکا و آلاسکا
آدنوویروس	ضعیف شده	پرسنل نظامی
تب زرد	ضعیف شده	مسافران در خطر تماس، پرسنل نظامی
هاری	غیر فعال شده	هر کسی که در معرض ویروس باشد، تماس قبلی؛ دامپزشکان و کسانی که با حیوانات سرو کار دارند.
آبله انسانی	ویروس واکسینیای زنده	محافظت مردم در برابر بیوتروریسم، نظامیان
آنسفالیت ژاپنی	غیر فعال شده	مسافران در خطر تماس

VLP، ذره شبه ویروس؛ gpE، گلیکوپروتئین E ویروس واریسلا زوستر.

•بر اساس فراوانی کاربرد لیست شده است.

فاقد خاصیت ویرولانس هستند، تشکیل شده‌اند (شکل ۱-۸ را ببینید). ویروس‌های نوع وحشی با رشد در تخم مرغ‌های جنینی یا کشت سلول‌های بافتی در دماهای غیر فیزیولوژیک (۲۵ تا ۳۴ درجه سانتی‌گراد) و یا دور از فشارهای انتخابی پاسخ‌های ایمنی میزبان تضعیف می‌شوند. این شرایط **انتخاب** یا اجازه رشد سویه‌های ویروسی (موتانت‌ها) که (۱) ویرولانس کمتری دارند زیرا آهسته در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (**سویه‌های حساس به دما** [مثل واکسن سرخک] و سویه‌هایی سازگار شده به سرما [واکسن آنفلوآنزا]) رشد می‌کنند، (۲) سوش‌های که به خوبی در هر سلول انسانی همانندسازی نمی‌کنند (**جهش یافته‌های محدود به میزبان**)، (۳) سوش‌هایی که نمی‌توانند از کنترل ایمنی فرار کنند و یا (۴) سوش‌هایی که می‌توانند در مکان بی‌خطر همانندسازی کنند اما در بافت هدف خاص که در طی بیماری درگیر می‌شود توانایی انتشار، اتصال یا تکثیر را ندارند (مثلا همانندسازی واکسن پولیو در دستگاه گوارش است اما نمی‌تواند به نورون‌ها برسد یا آنها را عفونی کند) را می‌دهد. مثال‌هایی از واکسن‌های ویروسی زنده ضعیف شده که هم اکنون مورد استفاده قرار می‌گیرند در جدول ۴-۸ فهرست شده است.

اولین واکسن، یعنی واکسن بیماری آبله توسط ادوارد جنر (Edward Jenner) ساخته شد. ایده ساخت واکسن از آنجا در وی شکل گرفت که او مشاهده کرد ویروس آبله گاوی (واکسینیا (Vaccinia)) که ویروس بیماریزا از گونه دیگر، است که دارای شاخص‌های آنتی‌ژنتیک مشترک با ویروس آبله انسانی است و می‌تواند عفونت‌های خوش خیمی را در انسان ایجاد کند و از طرفی پاسخ محافظتی علیه آبله انسانی نیز در فرد مبتلا به آبله گاوی ایجاد می‌شود. بعلاوه، مخلوطی از نوترتیبی ژنتیکی بین روتاویروس‌های گاوی و انسانی اساس واکسن رایج تجویز شونده برای محافظت نوزادان در برابر روتا ویروس انسانی می‌باشد.

در دهه ۱۹۵۰، آلبرت سابین (Albert Sabin) اولین واکسن پولیو خوراکی زنده (Live Oral Polio Vaccine (OPV)) را تولید نمود. این واکسن ویروس ضعیف شده به وسیله چندین بار پاساژ از سه تیپ پولیوویروس در سلول‌های کشت بافت کلیه میمون بدست آمد. حداقل ۵۷ موتاسیون در سویه واکسن پولیو تیپ I اتفاق افتاده است. زمانی که این واکسن به شکل خوراکی تجویز شود IgA در معده و IgG در سرم ترشح می‌گردد که در این حالت با طی دوره طبیعی عفونت به وسیله ویروس سوش وحشی مصونیت طولانی فراهم می‌گردد. این واکسن ارزان بوده، تجویز آن آسان است و نسبتاً پایدار می‌باشد و می‌تواند از طریق تماس‌های فرد ایمن شده گسترش یابد. برنامه‌های ایمن سازی مؤثر در اغلب کشورهای جهان منجر به ریشه‌کنی پولیو تیپ وحشی شده است (شکل ۲-۸ را ببینید). متأسفانه به دلیل خطر ایجاد بیماری از طریق واکسن زنده ضعیف شده (OPV)، IPV بیشتر از OPV برای ایمونیزاسیون خوب روتین نوزادان به کار برده می‌شود. اگرچه پاسخ ایمنی ایجادشده به وسیله IPV می‌تواند از گسترش ویروس به سیستم عصبی مرکزی و عضلات جلوگیری نموده و فرد را از بیماری محافظت کند، اما برخلاف OPV نمی‌تواند از تولید ویروس در مجرای معدی - روده‌ای و انتقال آن به سایر افراد از طریق مدفوع جلوگیری کند.

واکسن‌های HBV و HPV به صورت ژنتیکی مهندسی شده و در سلول‌های مخمر تکثیر داده شده‌اند. پروتئین‌های اتصالی ویروسی از HBV (آنتی‌ژنی سطحی HBV) ویروس HPV پروتئین L که تشکیل‌دهنده ذرات شبه ویروسی می‌باشند، در مقایسه با هر یک از پروتئین‌ها به تنهایی ایمونوژن‌های بهتری هستند. از طریق محدود نمودن گسترش این ویروس‌ها، این واکسن‌ها از سرطان‌های مرتبط با آنها نیز جلوگیری می‌نمایند (کارسینومای گردن رحم): HPV؛ کارسینومای هپاتوسلولار اولیه: HBV).

واکسن‌های زنده علیه سرخک، اوریون، سرخجه (که با هم تحت عنوان واکسن MMR تجویز می‌شود)، **واریسلا زوستر** و امروزه **آنفولاآنزا** پاسخ‌های قوی ایمنی سلولی و ایمنی خاطره‌ای موردنیاز برای محافظت از این ویروس‌ها را سبب می‌شوند. برای ایجاد پاسخ سلولی T بالغ، واکسن باید بعد از یک سالگی، زمانی که هیچ گونه تداخلی به وسیله آنتی‌بادی‌های مادری وجود ندارد و ایمنی وابسته به سلول به اندازه کافی بالغ شده، تجویز شود. ثابت شده که واکسن کشته شده سرخک به دلیل ایجاد ایمنی ناقص مؤثر نیست زیرا موجب بروز علایم شدید (سرخک آتیپیکال) در هنگام مواجه با ویروس سرخک تیپ وحشی می‌شود که این علایم مرتبط با عفونت طبیعی هستند.

واکسن سرخک زنده اولیه از سویه B ادمونستون (Edmonston B Strain) تهیه می‌گردد که اولین بار توسط اندرز (Enders) و همکارانش ساخته شد. این ویروس در سلول‌های اولیه کلیه انسان، سلول‌های آمنیون انسانی و سلول‌های جنینی جوجه در ۳۵ درجه سانتی‌گراد تحت پاساژ وسیع قرار گرفت. در حال حاضر سویه‌های واکسن موراتن (ایالات متحده) و شوآرتز (دیگر کشورها) سرخک با چهار پاساژ از سوش B ادمونستون در جنین جوجه در ۳۲ درجه سانتی‌گراد تهیه می‌شوند.

ویروس‌های واکسن اوریون (سویه جریل لین JeryL (Lynn Strain) و واکسن سرخجه (ویستار RA 27/3) به وسیله پاساژهای وسیع ویروس در کشت سلولی، ضعیف شده‌اند. در واکسن واریسلا زوستر از سویه اوکا (Oka Strain) که در واقع سویه ضعیف شده‌ای است استفاده می‌شود. واکسن واریسلا زوستر با واکسن MMR تجویز می‌گردد و یا یک نسخه قویتر آن به بالغین برای جلوگیری از بیماری زوستر (Shingles) تجویز می‌شود.

واکسن‌های سه ظرفیتی و چهار ظرفیتی آنفولاآنزا زنده از طریق بینی به شکل ذرات بخار تجویز می‌شود و تا سرمای ۲۵ درجه سانتیگراد نیز تطابق یافته است. بر

خلاف واکسن غیر فعال شده پیشین پاسخ‌های سلول B و T و ایمنی مخاطی توسط این واکسن به وجود می‌آیند. این واکسن را تنها می‌توان برای افراد ۲ تا ۴۹ سال تجویز کرد.

راهکارهای آینده برای واکسیناسیون

تکنیک‌های بیولوژی مولکولی برای توسعه واکسن‌های جدید به کار برده می‌شوند. واکسن‌های زنده جدید بجای اینکه از طریق تضعیف رندوم ویروس به وسیله پاساژ کشت بافت تهیه شوند می‌توانند از طریق جهش توسط مهندسی ژنتیک به منظور غیر فعال کردن یا حذف کردن یک ژن بیماریزا به وجود آیند. ژن‌هایی از عوامل عفونی که نمی‌توانند به شکل مناسبی ضعیف شوند می‌توانند وارد ویروس‌های بی‌خطر (مثلاً واکسینا، آبله قناری، آدنوویروس ضعیف‌شده) به منظور ایجاد **واکسن‌های ویروسی هیبرید (Hybrid Virus Vaccines)**، شوند. این دستاورد، نوید تولید واکسن پلی والان علیه بسیاری از عوامل در یک ناقل (Vector) منفرد، بی خطر، ارزان و نسبتاً پایدار را می‌دهد. در عفونت، واکسن ویروسی هیبرید نیاز به سیکل کامل همانندسازی ندارد، اما به سادگی بیان ژن وارد شده را برای شروع پاسخ ایمنی به آنتی‌ژن‌ها القاء می‌کند. سیستم‌های وکتور ویروس واکسینیا، آبله قناری (Canarypox) و آدنوویروس در چندین واکسن هیبریدی آزمایشی استفاده می‌شوند یک واکسن آبله قناری ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) که توسط دو بوستر ایمونیزاسیون توسط گلیکوپروتئین ۱۲۰ نوترکیب دنبال می‌شود یک ایمنی متوسط و قابل انتظار را نشان می‌دهد. واکسن بر پایه واکسینا برای ایمنی حیوانات جنگلی علیه هاری به کار برده می‌شود. ویروس‌های دیگری نیز به عنوان وکتور در نظر گرفته شده‌اند.

واکسن‌های زیر واحدی (Subunit Vaccines) مهندسی شده به طریق ژنتیکی با استفاده از کلون کردن ژن‌های کد کننده پروتئین‌هایی ایمونوژن به درون ناقلین یوکاریوتی یا باکتریایی تولید می‌شوند. بزرگترین مشکلات در توسعه چنین واکسن‌هایی (۱) تشخیص زیر واحد مناسب یا پپتید ایمونوژن که بتواند آنتی‌بادی محافظتی و به طور ایده آل پاسخ‌های سلولی وابسته به T ایجاد کند و (۲) آنتی‌ژن را در ترکیب مناسب ارائه نماید. وقتی عامل ایمونوژن شناسایی گشت، ژن جدا شده و در سلول‌های باکتری یا مخمر کلون شده و بیان می‌گردد و سپس به میزان زیادی از این پروتئین‌ها می‌توانند تولید گردند. پروتئین انولوپی gp120 از ویروس نقص ایمنی انسان (HIV)، هماگلوتینین و نورآمینیداز آنفولاآنزا، پروتئین G هاری و گلیکوپروتئین D از هرپس سیمپلکس ویروس کلون شده‌اند و پروتئین‌های آن‌ها در سلول‌های باکتریایی و یا یوکاریوتی برای استفاده (یا استفاده بالقوه) در واکسن‌های ساب یونیت، تولید می‌شوند.

واکسن‌های زیر واحدی پپتیدی (Peptide Subunit Vaccines) از *اپی‌توپ‌های اختصاصی* پروتئین‌های میکروبی که آنتی‌بادی خنثی کننده یا پاسخ‌های سلولی T را برمی‌انگیزند، تشکیل شده‌اند. برای تولید چنین پاسخی، پپتید باید حاوی توالی‌هایی باشد که روی دندریتیک سل‌ها به پروتئین‌های MHC کلاس I یا کلاس II (کمپلکس بزرگ سازگار نسجی کلاس I یا کلاس II) بچسبند و به سلول‌های T برای سازمان‌دهی دوباره و ایجاد پاسخ ایمنی عرضه شود. قدرت ایمنی‌زایی پپتید را می‌توان با اتصال کووالانی آن به یک پروتئین ناقل (مانند توکسوئید کزاز یا [Keyhole Limpet hemocyanin KLH]، یک لیگاند برای رسپتور شبه Toll (مانند فلاژین) یا یک پپتید ایمونولوژیک که به طور اختصاصی می‌تواند اپی‌توپ را برای ایجاد پاسخ ایمنی مناسب عرضه نماید، افزایش داد. با درک بهتر مکانیسم‌های عرضه آنتی‌ژن و آنتی‌ژن‌های اختصاصی گیرنده سلول T، واکسن‌های بهتری تولید می‌شوند.

ادجوانت‌ها (Adjuvants) علاوه بر آلوم (Alum) برای افزایش ایمنی‌زایی و جهت دادن پاسخ به واکسن‌ها به سمت پاسخ‌هایی از نوع TH1 و TH2 به واکسن اضافه می‌شوند. این‌ها شامل فعال کننده‌های رسپتورهای شبه Toll (Toll-like Receptors) از قبیل اولیگونوکلئوتید CpG، مشتقات لیپید A از لیپوپلی‌ساکارید، سایتوکین‌ها، لیپوزوم‌ها، نانوذرات و غیره می‌باشند.

واکسن‌های DNA و RNA برای ایمونیزاسیون بالقوه عظیم علیه عوامل عفونی و برای ایمونوتراپی تومور که نیاز به پاسخ‌های سلول T دارند پیشنهاد می‌شوند. برای این واکسن‌ها ژن مولد یک پروتئین که پاسخ‌های حفاظتی را تحریک می‌کنند در درون یک پلاسمید **(Plasmid)** کلون می‌شود که اجازه می‌دهد پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی

بیان شود. DNA برهنه را داخل عضله یا پوست فرد گیرنده واکسن تزریق می‌کنند تا بدین وسیله توسط سلول‌ها برداشت شود و ژن بیان گشته و پروتئین تولید شده، عرضه گردد و پاسخ‌های سلول T را فعال کند. واکسن‌های DNA برای تولید آنتی‌بادی به تقویت‌کننده‌هایی از جنس پروتئین آنتی‌ژنیک نیاز دارند. واکسن‌های RNA همانند نانوذرات عفونی ویروس‌های RNAدار، در آنها ژن مربوط به ایمونوژن با توالی‌هایی که بیان یا تکثیر آنرا در سلول تحریک می‌کنند متصل هستند و سپس RNA بیان و خالص شده و ممکن است در قالب یک لیپوزوم شبیه انولوپ ویروسی تجویز شوند. قدرت این واکسن‌ها را می‌توان با وارد نمودن ژن‌های مسئول سایتوکاین‌های تحریک کننده سیستم ایمنی افزایش داد.

سلول‌های دندرتیک (DCs) فعال شده اتولوگ که با آنتی‌ژن‌های توموری و سلول‌های T ضدتوموری فعال شده پوشیده شده‌اند را می‌توان در آزمایشگاه از سلول‌های خود بیمار تهیه نمود و مجدداً به عنوان ایمونوتراپی به داخل سرطان بیمار تزریق نمود. این دستاوردها همچنین بالقوه برای عفونت‌های ضد ویروسی یا سایر عفونت‌های ضدمیکروبی که به کنترل ایمنی وابسته به سلول نیاز دارند کاربرد دارند.

یک دستاورد جدید تحت عنوان واکسن‌شناسی معکوس (Reverse Vaccinology) برای تولید واکسن علیه نایسریا منتژیتیدیس تیپ B (*N. meningitidis B*) به کار برده شده است. بر اساس خصوصیات پروتئینی که از توالی ژن قابل پیش‌بینی است هزاران پروتئین از نظر توانایی آنها در ایجاد محافظت علیه عفونت با هدف شناسایی کاندیداهای پروتئینی تست شده‌اند. همینطور آنتی‌بادی بدست آمده از افرادی که دربرابر عفونت ناشی از پاتوژن‌های مهم زنده مانده‌اند را می‌توان برای شناسایی ایمونوژن‌های مناسب استفاده نمود. با ظهور این تکنولوژی و دیگر تکنولوژی‌های جدید، ساخت واکسن علیه بسیاری از عوامل عفونی از قبیل استرپتوکوکوس موتانس (جهت جلوگیری از پوسیدگی دندان)، هرپس ویروس‌ها، HIV و انگل‌هایی از قبیل پلاسمودیوم فالسیپاروم (مالاریا) و لیشمانیا امکان پذیر شده است. در حقیقت تولید واکسن برای هر عامل عفونی زمانی که ایمونوژن محافظتی مناسبی شناسایی شود و ژن آن جدا گردد بایستی ممکن باشد.

برنامه‌های ایمن سازی

برنامه واکسیناسیون مؤثر موجب میلیون‌ها دلار صرفه‌جویی در هزینه‌های مراقبت بهداشتی می‌گردد. چنین برنامه‌ای نه تنها هر شخص واکسینه شده را در برابر عوامل عفونی محافظت می‌کند بلکه تعداد افراد حساس در جامعه را کاهش می‌دهد در نتیجه از پخش عوامل عفونی در میان جمعیت جلوگیری می‌شود. گرچه ایمن سازی ممکن است بهترین روش برای محافظت مردم علیه عفونت باشد ولی واکسن‌ها نمی‌توانند برای تمام عوامل عفونی ساخته شوند. یک دلیل آن این است که ساخت چنین واکسن‌هایی هم وقت گیر و هم هزینه بردار می‌باشد. توصیه‌هایی برای انجام برنامه واکسیناسیون در کادر ۱-۸ آورده شده است.

آبله طبیعی به وسیله برنامه‌های مؤثر واکسیناسیون از بین برده شد زیرا کاندیدای خوبی برای چنین برنامه‌هایی بود، این ویروس تنها یک سروتیپ دارد، علایم بیماری همیشه به طور واضح در افراد آلوده ظاهر می‌شود و واکسن آن نسبتاً پایدار و بی‌خطر است. به هر حال، ریشه کنی و حذف آن فقط در نتیجه کمک‌ها و تلاش‌های متمرکز WHO و آژانس‌های بهداشتی محلی در سرتاسر جهان صورت پذیرفته است. رینوویروس مثالی برای یک کاندیدای ضعیف برای تولید واکسن می‌باشد زیرا بیماری ویروسی حاصل از آن‌ها جدی نیست و از طرفی تعداد زیادی سروتیپ برای اینکه واکسیناسیون موفق باشد، وجود دارد. جنبه‌های عملکردی و مشکلات تولید واکسن در کادر ۲-۸ آورده شده است.

کادر ۱-۸. ویژگی‌های یک کاندیدای خوب برای تولید واکسن

ارگانیسم سبب بیماری مشخصی شود.
ارگانیسم تنها یک سروتایپ داشته باشد.
میکروب فقط انسان را عفونی کند.
آنتی‌بادی موجب مهار عفونت یا انتشار سیستمیک آن شود.
واکسن در برابر حرارت مقاوم باشد به طوری که بتوان آن را به مناطق اندمیک منتقل ساخت.
ایمونیزاسیون فرد دریافت‌کننده و جمعیت را محافظت کند.

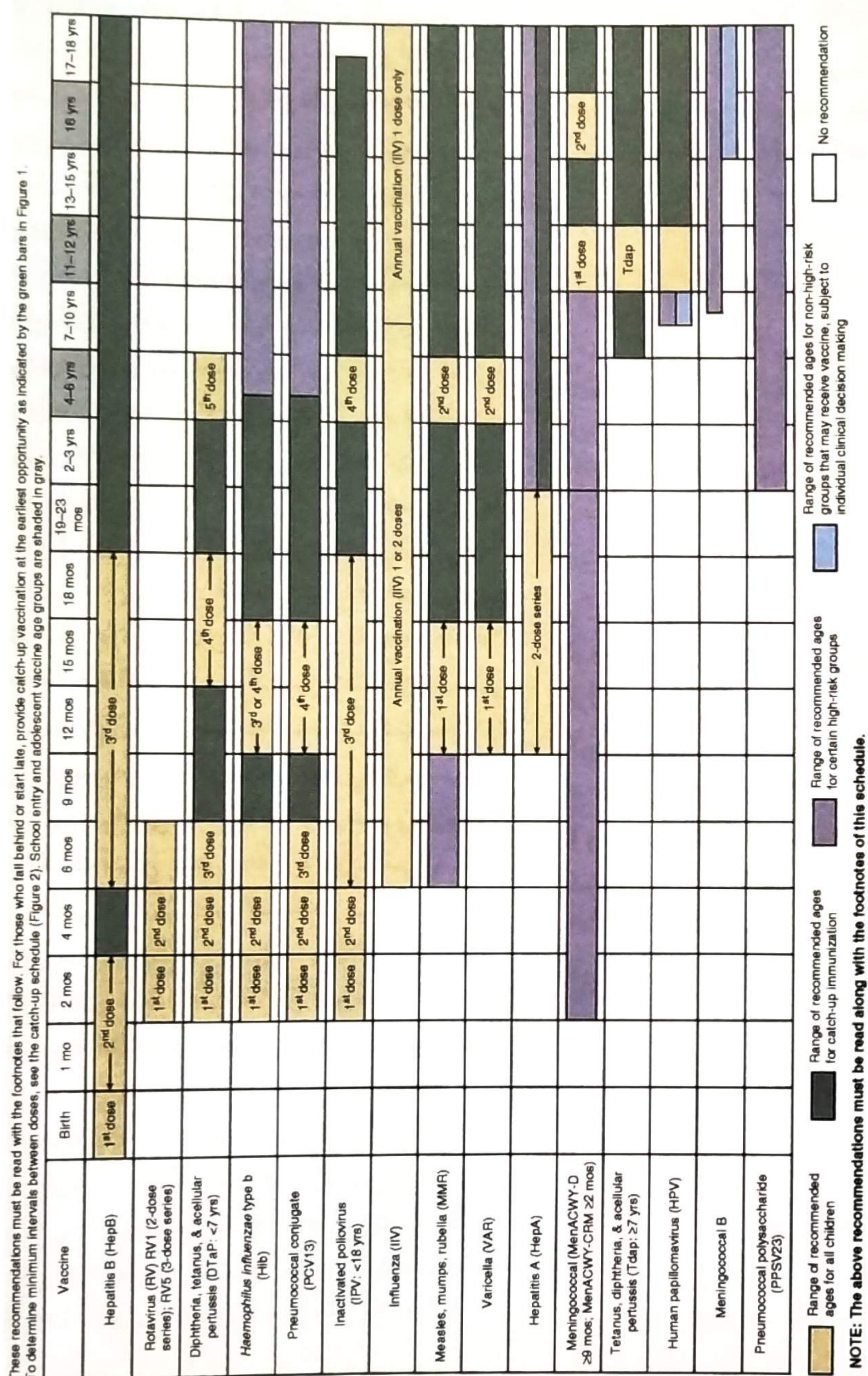


Fig. 11.3 Recommended childhood immunization schedule from the Centers for Disease Control and Prevention. Vaccines are listed at the ages routinely recommended for their administration. Bars indicate the range of acceptable ages for vaccination. References to footnotes refers to the website indicated below. *DTaP*, Diphtheria, tetanus, and acellular pertussis; *HepA*, hepatitis A; *HepB*, hepatitis B; *Hib*, *Haemophilus influenzae* type B; *IPV*, inactivated poliovirus; *MCV4*, quadrivalent conjugated meningococcal; *MMR*, measles, mumps, rubella; *PCV*, pneumococcal conjugate; *PPV*, pneumococcal polysaccharide; *Rota*, rotavirus. (From the Centers for Disease Control and Prevention Advisory Committee on Immunization Practices, 2018. Recommended immunization schedule for persons aged 0 through 6 years—United States, 2019 [PDF]. https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/hcp/imz/child-adolescent.html#birth-15. Accessed September 18, 2019.

شکل ۳-۸. جدول زمان‌بندی ایمونیزاسیون که توسط مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها برای دوران کودکی توصیه شده است. واکسن‌ها برحسب سنینی که به معمول برای تجویزشان پیشنهاد می‌شوند لیست شده‌اند. مربع‌های طیف سنین مورد قبول برای واکسیناسیون را نشان می‌دهد. DTaP: دیفتری، تتانی و پرتوزیس فاقد سلول، HepA: هپاتیت A، Hep B: هپاتیت B، Hib: هموفیلوس آنفولانزا نوع B، IPV: پولیو ویروس غیر فعال شده، MCV4: واکسن چهارظرفیتی کونژوگه مننگوکوکی، MMR: سرخک، اوریون و سرخجه؛ PCV: کونژگه پنوموکوک، PPV: پلی ساکارید پنوموکوک، Rota: روتاویروس.

از دیدگاه شخصی، واکسن ایده آل واکسنی است که دوره ایمنی‌زایی آن در برابر عفونت طولانی و اثرات جانبی شدید آن بسیار ناچیز باشد. فاکتورهایی که موفقیت برنامه ایمن سازی را تحت تأثیر قرار می‌دهند نه تنها به ترکیب واکسن بلکه به زمان، محل و شرایط تجویز آن و سن و جنس دریافت کنندگان نیز بستگی دارد.

در شکل ۳-۸ برنامه‌های پیشنهاد شده واکسیناسیون‌ها برای کودکان آورده شده است. جداولی از برنامه‌های پیشنهادی برای واکسیناسیون کودکان، نوجوانان، بالغین و برای موارد خاص سالانه توسط کمیته نظارت بر عملکردهای ایمن‌سازی (ACIP) مراکز کنترل بیماری‌ها تهیه می‌شود.

ایمنی یادآور (Booster Immunization) واکسن‌های غیر فعال و واکسن زنده سرخک در مراحل بعدی زندگی مورد نیاز است. زنان زیر سن ۲۶ سالگی باید واکسن پاپیلوما و دانشجویان باید واکسن مننگوکوک (Meningococcal Vaccine) یا یادآور را دریافت کنند. بزرگسالان بایستی علیه استرپتوکوکوس پنومونیه (پنوموکوک)، آنفولاآنزا، هاری، ویروس هپاتیت B و سایر بیماری‌های، بسته به شغل، نوع مسافرتی که آن‌ها انجام می‌دهند و فاکتورهای خطر دیگر که ممکن است آن‌ها را به طور خاصی به عوامل عفونی خاصی حساس کند، واکسینه شوند.

علی‌رغم پیشرفت قابل‌توجهی در محافظت از جمعیت در برابر بیماری شدید با استفاده از واکسن‌ها صورت گرفته، نارضایتی و اطلاعات نادرستی که در خصوص ایمنی

کادر ۲-۸. مشکلات همراه با استفاده از واکسن

واکسن زنده گاهی به اشکال ویرولانس خود تبدیل می‌شود. واکسیناسیون فرد دارای ضعف سیستم ایمنی با واکسن زنده می‌تواند زندگی فرد را تهدید کند.

اثرات جانبی در اثر واکسیناسیون می‌تواند رخ دهد، این موارد شامل ازدیاد حساسیت و واکنش‌های آلرژی در برابر آنتی‌ژن، مواد غیرمیکروبی موجود در واکسن و آلودگی‌ها (مانند تخم مرغ‌ها).

تولید واکسن همراه با خطر بالا بوده و سود محدودی دارد.

اطلاعات نادرست درباره ایمنی واکسن‌ها سبب می‌شود که واکسن‌های مهم کمتر مورد استفاده قرار گیرند.

کنترل میکروب‌های دارای چندین سروتایپ با واکسیناسیون مشکل می‌باشد.

واکسن‌ها منتشر می‌شود سبب خودداری برخی از افراد و کودکانشان از انجام واکسیناسیون شده است. این موضوع افراد را در خطر بیماری قرار داده و می‌تواند تثبیت ایمنی گروهی گردد که نتیجه آن طغیان‌ها و قرار گرفتن نوزادان در خطر بیشتر ابتلا به این بیماری‌ها می‌باشد. برای مثال با وجودی که ۹۵ درصد جامعه علیه بیماری سرخک ایمن شده‌اند اما طغیان این بیماری اتفاق خواهد افتاد. در سال ۲۰۱۸ طغیان سرخک به مراحل طغیان در اروپا رسید به طوری که بیش از ۶۰۰۰۰ مورد بیماری و بیش از ۵۰ مرگ توسط واکسن ضعیف رخ داد.

سؤال‌ها

۱. چرا استفاده از واکسن غیر فعال شده نسبت به واکسن زنده در مورد بیماری‌های زیر ارجحیت دارد: هاری، آنفولانزا، کزاز، هپاتیت B، هموفیلوس آنفولاآنزا B، دیفتری، پولیو و سیاه سرفه؟

۲. بیماری کزاز با ایمن سازی غیر فعال درمان می‌شود و با ایمن سازی فعال پیشگیری می‌شود. هر کدام از این درمان‌ها را هم از نظر عملکرد و هم از نظر ماهیت مقایسه کنید.

۳. واکسن پولیو غیر فعال شده به شکل داخل عضلانی در حالیکه واکسن پولیو زنده بصورت خوراکی تجویز می‌گردد. کدام پاسخ ایمنی و ایمونوگلوبولین نسبت به این واکسن‌ها تولید می‌شود؟ چه مرحله‌ای از عفونت پولیو ویروس در یک شخص واکسینه توسط هر کدام از واکسن‌ها مهار می‌گردد؟

۴. چرا برنامه‌های واکسیناسیون در مقیاس بزرگ برای راینوویروس، ویروس هرپس سیمپلکس و ویروس سنسیشیال تنفسی توسعه نیافته است؟

۵. شرح دهید توسعه برنامه واکسیناسیون علیه سرخک، اوریون، سرخجه، پولیو، آبله، کزاز و سیاه سرفه چه سودی برای بهداشت و سلامت فردی و اجتماعی دارد؟

۶. ایمونیزاسیون با واکسن‌های پلی‌ساکارید کپسولی و واکسن‌های پلی‌ساکاریدی کونژوگه برای استرپتوکوکوس پنومونیه سبب تحریک انواع مختلفی از ایمنی شده و برای افراد مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. دریافت‌کنندگان این واکسن‌ها چه کسانی هستند؟ مزایا و معایب هر یک کدامند؟

پاسخ‌ها

۱. واکسن غیرفعال زمانی استفاده می‌شود که واکسن زنده تخفیف حدت یافته را نمی‌توان به صورت ایمن تولید کرد یا زمانی که پاسخ آنتی‌بادی برای ایجاد محافظت کفایت می‌کند. اگرچه برای آنفلوآنزا اغلب از واکسن غیرفعال استفاده می‌شود ولی در حال حاضر یک واکسن زنده مجوز استفاده گرفته است اما فقط بین سنین ۲ تا ۴۹ سال استفاده می‌شود.

۲. درمان توسط ایمنی غیرفعال با آنتی‌بادی، شبیه استفاده از دارویی است که فعالیت توکسین تتانوس را مهار می‌کند. هرچند این نوع درمان سریع است ولی تا زمانی دوام می‌آورد که آنتی‌بادی از بدن پاکسازی شود. یعنی تقریباً ۲ ماه پاسخ ایمنی فعال باعث ایجاد سلول‌هایی می‌شود که پاسخ ایمنی را به راه می‌اندازد که نسبت به ایمنی غیرفعال قوی‌تر و بادوام‌تر است ولی زمان‌بر است.

۳. واکسن غیرفعال پولیو به طور غالب پاسخ ایمنی از نوع آنتی‌بادی IgG (TH2) را افزایش می‌دهد. این آنتی‌بادی از ایجاد عفونت جلوگیری نمی‌کند ولی برای مهار گسترش ویروس پولیو در جریان خون از بافت هدف خود که بدان دسترسی پیدا کرده، کافی است و از اینرو از بیماری جلوگیری می‌کنند. واکسن خوراکی فرد را با موتانت‌هایی از سه تیپ پولیوویروس آلوده می‌کند تا پاسخ طبیعی یعنی پاسخ IgA ترشحی علیه هر ویروس آغاز شود. IgA هر ویروس تولیدشده در مجرای معدی - روده‌ای را خنثی می‌کند و مانع آن می‌شود که آن سایر سلول‌ها یا افراد دیگر را عفونی کند.

پاسخ‌ها

گسترش سلول‌های خاطره‌ای قوی‌تر و پایدارتر است.

۴. واکسن برای این میکروب‌ها به دلایل زیر تاکنون توصیه نشده است:

رینو ویروس: تعداد زیادی سروتیپ دارد. سایر ویروس‌ها باعث ایجاد عفونت مشابه عفونت رینو ویروس می‌شوند. بیماری ایجادشده تهدیدکننده حیات نیست.

ویروس هرپس سیمپلکس: ویروس در مقابل ایمنی سلولی و همورال محافظت می‌شود اما گسترش ویروس از مکان اولیه به نورون‌ها باید مهار شود و ممکن است ویروس در این زمان توسط آنتی‌بادی مخفی شده باشد (سایر واکسن‌ها تنها از گسترش ویرمی جلوگیری می‌کنند). ویروس‌های ضعیف‌شده که به طور قابل قبولی ایمن هستند هنوز توسعه پیدا نکرده‌اند.

ویروس سندرم تنفسی: پاسخ ایمنی وابسته به سلول و وابسته به آنتی‌بادی باید افزایش یابد. ویروس می‌تواند گسترش سلول به سلول انجام دهد و بدین صورت از کنترل توسط آنتی‌بادی فرار کند. هرچند تعداد محدودی سویه دارد ولی ویروس‌های متفاوت می‌توانند بیماری مشابه آن ایجاد کنند.

۵. این عوامل باعث مرگ و میر چشمگیری در افراد دچار عفونت می‌شوند: برای این عوامل، سروتیپ‌های محدودی وجود دارد و واکسن ارزان، ایمن و بادوام می‌تواند برای آن تولید شود.

سرخک و آبله کشنده‌تر هستند و تنها یک سروتیپ دارند به علاوه آبله همیشه بیماری همراه با علایم ایجاد می‌کند که این مسئله امکان گارانتی بودن موفقیت استفاده از واکسیناسیون را می‌دهد.

اوریون یک مشکل محسوب می‌شود ولی معمولاً تهدیدکننده نیست و تنها یک سروتیپ دارد. یک واکسن زنده مؤثر علیه آن تولید شده که می‌تواند آن را همراه با واکسن سرخک و سرخجه تزریق کرد.

واکسن سرخجه به منظور کاهش ایجاد بیماری‌های مادرزادی ایجاد شده است. این ویروس تنها یک سروتیپ دارد.

واکسن کزاز از جنس توکسوئید است که باعث تحریک تولید آنتی‌بادی‌هایی می‌شود که از فعالیت توکسین جلوگیری می‌کنند. ایمن‌سازی‌های یادآور لازم هستند. کزاز یک بیماری شایع تهدیدکننده حیات است.

واکسن فاقد سلول سیاه سرفه از سرفه‌های Whooping جلوگیری می‌کند. سیاه سرفه یک عفونت کشنده در بچه‌های جوان است. افزایش عفونت این بیماری در جوانان و بالغین، استفاده از تزریق یادآور را تقویت کرده است.

۶. ایمن‌سازی با پلی‌ساکارید کپسولی برای استرپتوکوکوس پنومونیه پاسخ‌های وابسته به سلول T یعنی IgM و نه آنتی‌بادی IgG را تحریک می‌کند و پاسخ‌های خاطره‌ای محدود یا هیچ نوع پاسخی ایجاد نمی‌کند. IgM محدود به گردش خون است. IgM سبب تسهیل پاکسازی باکتری‌ها از خون می‌شود تا از بیماری جلوگیری کند. ریه فرد محافظت‌شده نیست و عفونت و گسترش باکتری‌ها به آن می‌تواند رخ دهد. از اینرو تیپ‌های بیشتری از استرپتوکوکوس پنومونیه در واکسن وجود دارند تا محافظت‌های وسیع‌تری را برای کسانی که در خطر هستند (افراد مسن و فاقد طحال) ایجاد نماید. ایمن‌سازی با واکسن پلی‌ساکاریدی کونژوگه برای استرپتوکوکوس پنومونیه پاسخ‌های وابسته به سلول T را که شامل IgG، IgM (اما نه IgA ترشحی) و سلول‌های خاطره‌ای می‌شود را تحریک می‌کند. IgG می‌تواند به درون ریه راه پیدا کرده یا انتقال یابد تا عفونت را محدود و همینطور از گسترش باکتری‌ها جلوگیری کند. ایمنی برای مدت خیلی بیشتری باقی مانده و نیاز به ایمن‌سازی‌ها با یادآور فراوان ندارد.

بخش ٤

باکتری‌شناسی

فصل ۹

رده‌بندی، ساختار و تکثیر باکتری‌ها

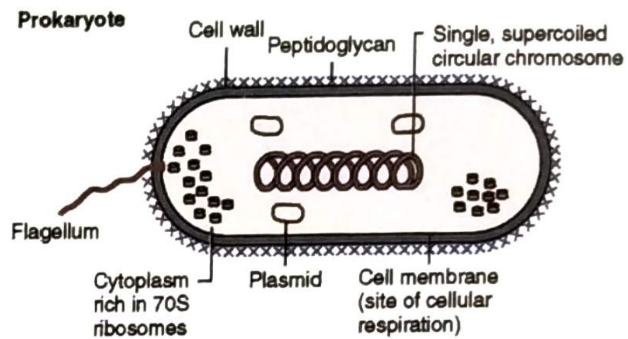
تفاوت‌های ساختاری بین باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها آغازگر حفاظت‌های میزبان در انسان‌ها بوده و پایه ای برای بسیاری از درمان‌های ضدمیکروبی را فراهم می‌سازد. دسته‌بندی باکتری‌ها بعنوان گرم مثبت، گرم منفی یا اسیدفاست نشان دهنده اساس تفاوت‌ها در روش‌های انتقال، بروز بیماری و حساسیت‌های آنتی‌بیوتیکی است. ساختارهای خارجی باکتری‌ها عملکردهای ساختار و انتقال، روش‌هایی برای تعامل با سلول‌های باکتریایی دیگر و میزبان در قالب فاکتورهای بیماریزایی و پوشش الگوهای ملکولی وابسته به پاتوژن (PAMP) که تحریک کننده پاسخ‌های ذاتی و ایمنی هستند را فراهم می‌سازند.

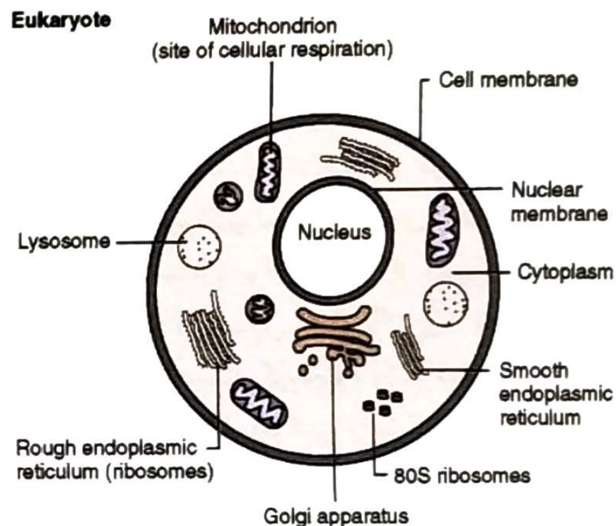
کوچکترین باکتری‌ها (کلامیدیا (Chlamydia) و ریکتزیا (Rickettsia)) فقط ۰/۱ تا ۰/۲ میکرون قطر دارند در حالیکه بزرگترین باکتری‌ها ممکن است چندین میکرون طول داشته باشند. یک گونه اخیراً کشف شده که صدها برابر بزرگتر از میانگین اندازه سلول باکتریایی است و با چشم غیر مسلح هم قابل دیدن است. با این وجود، بیشتر گونه‌ها تقریبا یک میکرومتر قطر دارند بنابراین توسط میکروسکوپ نوری که قدرت تفکیک آن ۰/۲ میکرومتر است قابل مشاهده هستند. در عوض، سلول‌های گیاهی و حیوانی خیلی بزرگ‌تر هستند و حدود اندازه آن‌ها بین ۷ میکرومتر (قطر سلول‌های قرمز خونی) تا چندین فوت (طول بعضی از سلول‌های عصبی) می‌باشند.

تفاوت‌های بین یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها

سلول‌های حیوانی، گیاهی و قارچی جزء یوکاریوت‌ها **(Eukaryotes)** هستند (در زبان یونانی به معنای هسته واقعی). در حالی که باکتری‌ها، آرکئه‌آ **(Archae)** و جلبک‌های سبز - آبی (Blue-green Algae) جزء پروکاریوت‌ها **(Prokaryotes)** هستند (در زبان یونانی به معنای هسته اولیه). آرکئه‌آ (آرکئاباکتری‌ها) شباهت‌های زیادی به باکتری‌ها دارند ولی در دومین (Domain) جداگانه‌ای از یوکاریوت‌ها و باکتری‌ها قرار می‌گیرند.

پروکاریوت‌ها با یوکاریوت‌ها از چندین جهت تفاوت دارند (جدول ۱-۹، شکل ۱-۹). باکتری‌ها فاقد هسته و سایر ارگانل‌ها هستند. کروموزوم یک باکتری تیپیک مانند اشرشیاکلی یک ملکول دئوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) منفرد دو رشته ای (Double-stranded) و حلقوی (Circular) است که تقریبا محتوی ۵ میلیون جفت باز (یا ۵۰۰۰ کیلو جفت باز (Kb)) است و حدود اندازه این کروموزوم ۱/۳ میلی متر است (یعنی تقریباً ۱۰۰۰ برابر قطر سلول است). کوچکترین کروموزوم‌های باکتریایی (مایکوپلاسماها) تقریباً یک چهارم این اندازه است. در مقابل، انسان دو کپی از ۲۳ عدد کروموزوم دارد که دارای $۲/۹ \times ۱۰^{۹}$ جفت کیلو باز است و ۹۹۰ میلی‌متر طول دارد. باکتری‌ها از یک ریبوزوم کوچکتر یعنی ریبوزوم 70S استفاده می‌کنند. در اغلب باکتری‌ها دیواره سلولی پپتیدوگلیکانی مشبک مانند غشاء سلولی را احاطه می‌کند و کار حفاظت از آنها در برابر شرایط محیطی را بر عهده دارد. باکتری می‌تواند در شرایط محیطی نامناسب که فشار اسمزی خارج سلول بسیار پایین است طوری که اغلب سلول‌های یوکاریوت لیز می‌شوند، در گستره دمایی زیاد (هم دمای خیلی کم و هم دمای خیلی زیاد)، در خشکی و محلول‌های خیلی رقیق و متفاوت از نظر منابع انرژی زنده مانده و در برخی موارد رشد کنند. باکتری‌ها می‌توانند از نظر ساختارها و عملکردهای خود با این شرایط تطبیق پیدا کنند. این موارد و سایر خصوصیات متمایز باکتری در شکل ۱-۹ و جدول ۱-۹ نمایش داده شده است. بسیاری از این تفاوت‌ها فراهم‌کننده اساس فعالیت مواد ضد میکروبی است.





شکل ۱-۹. خصوصیات اصلی یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها.

رده‌بندی باکتری‌ها

باکتری را می‌توان به کمک خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی، خصوصیات رشد و ویژگی‌های متابولیک، آنتی ژنیسیته آنها و در نهایت توسط ژنوتیپ آنها طبقه‌بندی کرد.

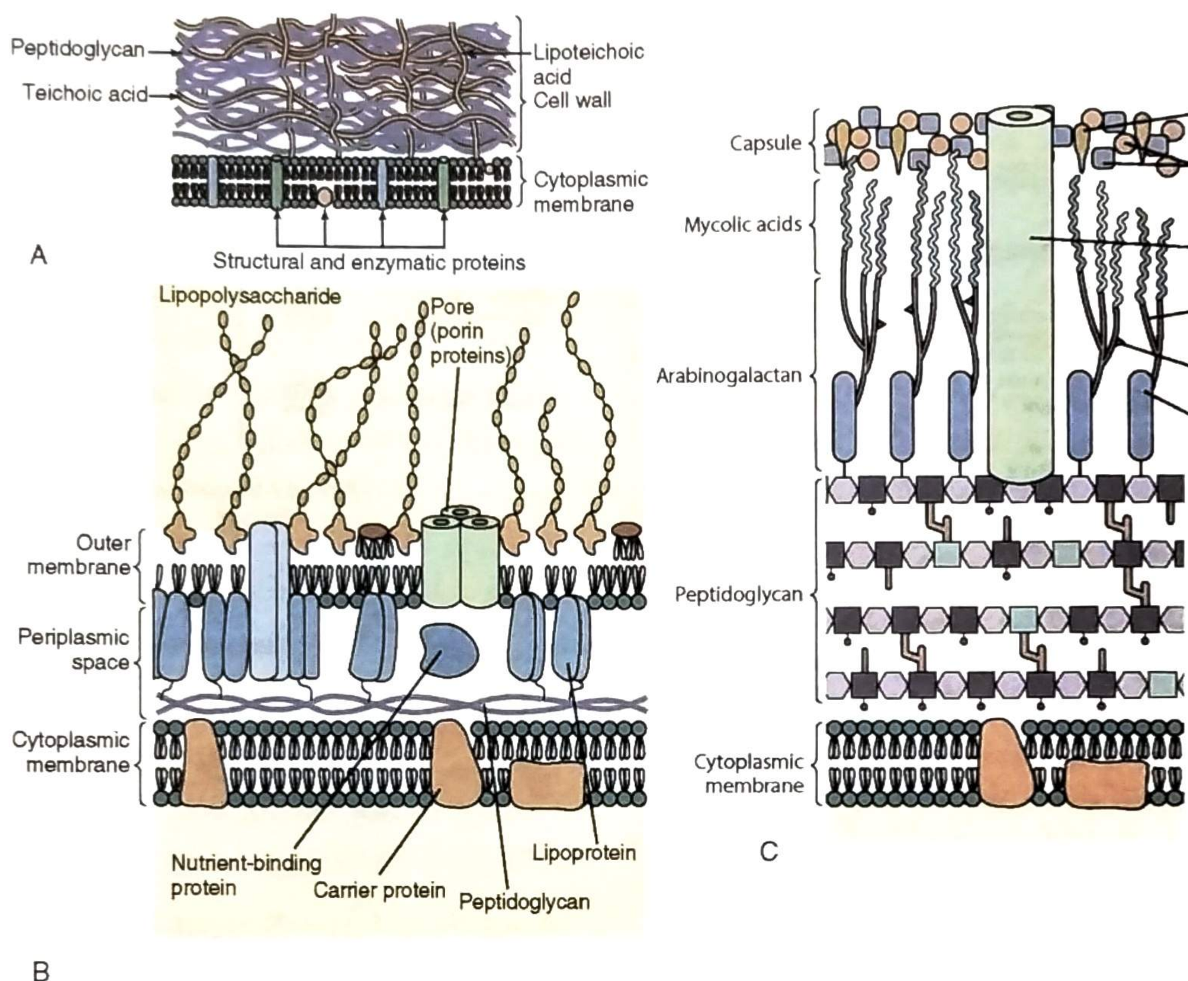
تشخیص ماکروسکوپی و میکروسکوپی

افتراق اولیه بین باکتری‌ها می‌تواند بر اساس خصوصیات رشـد آن‌ها روی محیط‌های مختلف مغذی و انتخابی باشد. باکتری‌ها به صورت کلونی رشد می‌کنند، هر کلونی مانند یک شهر با میلیون‌ها یا بیشتر ارگانیسم است. مجموع خصوصیات آنها سبب ایجاد کلونی‌هایی می‌شوند که از نظر خصوصیاتی نظیر شـکل، اندازه، رنـگ و بو با هـم متفاوت‌اند. توانایی مقاومـت به آنتی بیوتیک‌های مختلف، توانایی تخمیر قندها (مانند لاکتوز جهت افتراق بین اشریشـیاکلی و سالمونلا)، لیز اریترویسـت‌ها (خصوصیت همولیتیکی استرپتوکوکی) یـا هیدرولیز لیپیدها (مانند لیپاز کلسـتریدیومی) را می‌توان همچنین با استفاده از محیط‌های رشد مناسب مشخص کرد.

جدول ۱-۹. خصوصیات اصلی یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها

ویژگی	یوکاریوت	پروکاریوت
گروه‌های اصلی	جلبک، قارچ، پروتوزآها، گیاهان و حیوانات	باکتری‌ها
اندازه (تقریبی)	>5µm	0.5-3µm
ساختارهای هسته ای		
هسته	دارای غشاء کلاسیک	بدون غشاء هسته ای
کروموزوم‌ها	رشته‌هایی از ژنوم DNA دیپلوئید	ژنوم DNAهاپلوئید حلقوی منفرد
ساختارهای سیتوپلاسمی		
میتوکندری	دارد	ندارد
اجسام گلژی	دارد	ندارد
شبکه اندوپلاسمی	دارد	ندارد
ریبوزوم‌ها (ضریب رسوبی)	80S(60S+40S)	70S(50S+30S)
غشاء سیتوپلاسمی	دارای استرول‌ها	فاقد استرول‌ها (به استثناء مایکوپلاسما)
دیواره سلولی	در قارچ وجود دارد، در بقیه وجود ندارد	یک ساختار پیچیده حاوی پروتئین و پپتیدوگلیکان‌ها است، ممکن است حاوی پلی‌ساکاریدها، تیکوئیک اسید و لیپوپلی ساکارید باشد.
تولید مثل	جنسی و غیرجنسی	غیرجنسی (تقسیم دوتایی)
حرکت	با فلاژله پیچیده، در صورت وجود	با فلاژله ساده، در صورت وجود
انتقال الکترونی(تولیدATP)	از طریق میتوکندری	از طریق غشاء سیتوپلاسمی

ATP، آدنوزین تری فسفات



شکل ۲-۹. مقایسه دیواره‌های سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی. A، یک باکتری گرم مثبت که دارای لایه ضخیمی از پپتیدوگلیکان است و دارای تایکوئیک اسید و لیپوتایکوئیک اسید است. B، یک باکتری گرم منفی که یک لایه پپتیدوگلیکان نازک و یک غشاء خارجی دارد که حاوی لیپوپلی ساکارید، فسفولیپید و پروتئین‌های انتقالی. تجزیه کننده و سنتز کننده دیواره سلولی است. غشاء خارجی در نقاط چسبندگی به غشاء سیتوپلاسمی متصل می‌شود و از طریق اتصالات لیپوپروتئین به پپتیدوگلیکان متصل می‌شود. C، دیواره‌های سلول مایکوباکتریال رنگ‌آمیزی اسید-فاست را به باکتری‌ها اعطاء می‌نمایند. آنها دارای یک ساختار پیچیده با غشاء خارجی واکسی غنی از لیپید از اسیدهای مایکولیک همراه با پورین‌هایی که در آن لایه نفوذ کرده‌اند، می‌باشند.

ظاهر میکروسکوپی شامل اندازه، شکل و پیکربندی ارگانیسم‌ها (کوکسی، میله‌ای، خمیده یا مارپیچی) و توانایی آنها در نگهداری رنگ گرم (گرم مثبت یا گرم منفی) اهداف اولیه برای شناسایی باکتری‌ها هستند. یک باکتری کروی مانند استافیلوکوکوس یک کوکسی است، یک باکتری میله‌ای شکل مانند اشریشیاکلی یک باسیل است و یک ترپونمای مارپیچی شکل (Snakelike Treponeme) یک اسپیریلوم است به علاوه، گونه‌های نوکاردیا و اکتینومایسس ظاهر رشته‌ای منشعب شبیه قارچ‌ها دارند. بعضی از باکتری توده‌هایی ایجاد می‌کنند از قبیل دسته‌های خوشه انگوری شکل (Grapelike Clusters) *استافیلوکوکوس اورئوس* یا دیپلوکوک‌هایی (دو سلول در کنار هم) که در گونه‌های *استرپتوکوکوس* و *نایسریا* دیده می‌شود.

رنگ آمیزی گرم (Gram Stain) یک تست آسان، قوی و سریع است که به پزشکان امکان افتراق بین دو گروه اصلی از باکتری‌ها را می‌دهد که بر پایه آن می‌توان یک تشخیص اولیه کلینیکی داد و بر پایه تفاوت‌های ذاتی موجود بین باکتری‌ها، درمان اولیه را آغاز کرد (شکل ۲-۹). در این تست باکتری‌هایی که توسط گرما تثبیت شده‌اند و یا به صورت دیگری روی اسلاید خشک شده‌اند با کریستال

Gram-Positive *Staphylococcus aureus* | Gram-Negative *Escherichia coli*

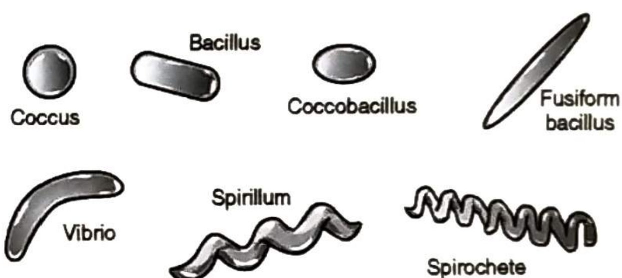
Step 1 Crystal violet

Step 2 Gram iodine

Step 3 Decolorizer (alcohol or acetone)

Step 4 Safranin red

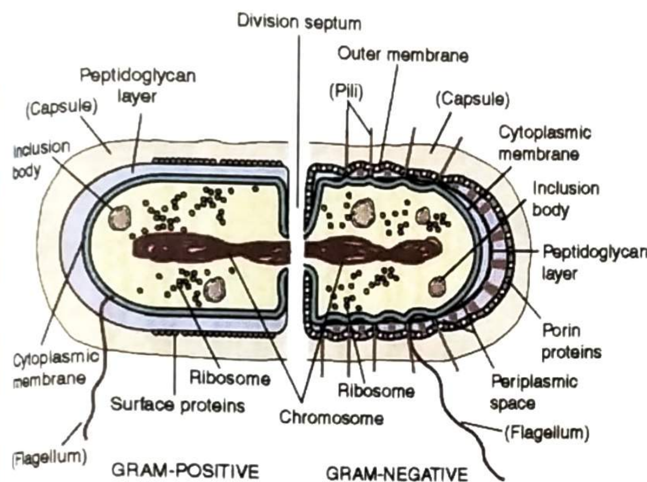
A



شکل ۳-۹. مورفولوژی رنگ آمیزی گرم باکتری‌ها. A، کریستال ویوله در رنگ گرم توسط ید رسوب می‌کند و در باکتری‌های گرم مثبت در لایه ضخیم پپتیدوگلیکان به دام می‌افتد. رنگ زدایی موجب از بین رفتن رنگ در غشاء خارجی و شستشوی رنگ کریستال ویوله از لایه نازک پپتیدوگلیکان می‌شود. باکتری‌های گرم منفی با رنگ قرمز متضاد قابل دیدن هستند.B، مورفولوژی‌های باکتریایی.

ویوله (Crystal Violet) رنگ می‌شوند (شکل ۳-۹)، رنگ با اضافه نمودن ید (Iodine) رسوب می‌کند و سپس رنگ متصل نشده، و اضافه توسط شستشو با محلول رنگبر بر پایه استن (Acetone-based Decolorizer) و آب برداشته می‌شود. در پایان رنگ متضادی مانند سافرانین (Safranin) اضافه می‌شود که همه سلول‌های بی رنگ شده را رنگ می‌کند، این رنگ‌آمیزی کمتر از ۱۰ دقیقه زمان می‌برد.

در مورد باکتری‌های گرم مثبت که به رنگ بنفش (Purple) درمی‌آیند رنگ در لایه پپتیدوگلیکان که یک ساختار شبکه مانند (Meshlike Structure) با اتصالات متقاطع (Cross-linked) و ضخیم بوده و اطراف سلول را احاطه کرده است به دام می‌افتد. باکتری‌های گرم



شکل ۴-۹. باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی. A، باکتری گرم مثبت دارای لایه ضخیمی از پپتیدوگلیکان (فضایی که در سمت چپ با رنگ بنفش مشخص شده است). یک باکتری گرم منفی یک لایه نازک از پپتیدوگلیکان (خطوطی که با رنگ سیاه مشخص شده) و غشاء خارجی (در سمت راست)، دارد. ساختارهای موجود در پرانتز در تمام باکتری‌ها وجود ندارند. هنگام تقسیم سلولی غشاء سلولی و پپتیدوگلیکان به طرف هم رشد می‌کنند و یک دیواره تقسیم کننده برای جدا نمودن سلول‌های دختری ایجاد می‌کنند.

منفی لایه نازکی از پپتیدوگلیکان دارند که نمی‌تواند رنگ کریستال ویوله را در خود نگه دارد به همین خاطر سلول‌ها با رنگ متضاد (سافرانین) رنگ می‌شوند و به رنگ قرمز (Red) درمی‌آیند (شکل ۴-۹). یک شیوه حفظ کردن که ممکن است کمک کننده باشد به صورت **" P-PURPLE-POSITIVE "** است.

به علت تجزیه پپتیدوگلیکان، رنگ‌آمیزی گرم برای باکتری‌هایی که از بی‌غذایی مرده‌اند (مانند کشت‌های کهنه یا کشتی که در مرحله فاز ثابت است) یا با آنتی بیوتیک‌ها درمان شده اند، قابل اعتماد نیست. باکتری‌هایی که نمی‌توان آن‌ها را توسط روش رنگ‌آمیزی گرم تقسیم بندی کرد شامل مایکوباکتریوم‌ها که یک پوسته خارجی مومی دارند و با رنگ‌آمیزی اسیدفست (Acid-fast) تشخیص داده می‌شوند و مایکوپلاسماها که فاقد پپتیدوگلیکان هستند، می‌باشند.

تفاوت متابولیکی، آنتی‌ژنیکی و ژنتیکی

سطح بعدی طبقه‌بندی بر پایه نشانه‌های متابولیک باکتری‌ها، شامل نیاز به محیط‌های بی‌هوازی یا هوازی،

نیاز به مواد غذایی خـاص (مانند تخمیر کربوهیدرات‌های خـاص یا اسـتفاده از ترکیبـات مختلف به عنـوان منبع کربن برای رشـد) و تولید محصولات متابولیکی مشخص (مانند اسـید، الکل‌ها) و آنزیم‌های خـاص (مانند کاتالاز استافیلوکوکوسـی) می باشـد. روش های اتوماتیک برای شناسایی باکتری های روده ای و دیگر باکتری‌ها گسترش یافته اسـت. این روش‌ها رشـد باکتری‌ها در محیط های مختلف و محصولات میکروبـی آنها را آنالیز نموده و یک بیوتیپ عددی برای هر کدام از باکتری‌ها ارائه می نمایند.

سـویه خاصـی از باکتری‌ها را می‌توان با اسـتفاده از آنتی‌بادی‌هایی برای شناسـایی آنتی‌ژن‌های خاص بر روی باکتری‌ها، تشـخیص داد (سـروتایپینگ (Serotyping)). این تسـت‌های سـرولوژیک را می‌تـوان همچنین برای باکتری‌هایی که در آزمایشـگاه رشد آن‌ها مشکل (*ترپونما پالیـدوم* ارگانیسـم عامل بیماری سـیفلیس) یا بسـیار خطرناک (*فرانسیسلا* ارگانیسـم عامل تولارمی) بوده یا با سندرم‌های بیماری خاصی مرتبط‌اند (اشریشیاکلی سروتیپ O157:H7 عامـل کولیت هموراژیک) و یا مواردی که نیاز به تشخیص سریع دارند (اسـترپتوکوکوس عامل فارنژیت استرپتوکوکوسـی) نیز بـه کار برد. روش سـروتایپینگ همچنین برای طبقه‌بندی باکتری‌ها به زیر سـطح گونه‌ها جهت اهداف اپیدمیولوژیکی به کار می‌رود.

دقیق‌تریـن روش طبقه‌بنـدی باکتری‌هـا آنالیز ماده ژنتیکی آن‌هاسـت. روش‌های جدید تشـخیص باکتری‌ها ردیابی توالی‌های خاصی از DNA است. این تکنیک‌ها شامل هیبریدیزاسیون DNA (DNA Hybridization)، تکثیر به کمک واکنش زنجیره پلی مـراز (PCR)، توالی‌یابی DNA و سـایر تکنیک‌هایی که در فصل ۵ شرح داده شده است، می‌باشند. پروفایل‌های پروتئین خاص باکتری‌ها نیز می‌تواند به سرعت توسط اسـپکترومتری جرمی (MALDI-TOF) آنالیز شـوند. در این روش‌های ژنتیکی به باکتری زنده و یا در حال رشـد نیازی نیست و می‌توان از آن‌ها برای ردیابی باکتری‌هایی که رشد آهسته دارند (از قبیل مایکوباکتریوم‌ها و قارچ‌ها) یا حتـی آنالیز نمونه‌های پاتولـوژی باکتری‌ها بسیار بیماری‌زا اسـتفاده کرد. توالی‌های DNA ریبوزومی (Ribosomal DNA) می‌توانـد برای شناسـایی خانواده یا جنس و تشـخیص گونه‌ها و زیرگونه‌هـا تعیین گردند. در سـال‌های اخیر جنبه‌های تکنیکی این روش‌ها ساده شده است به طوریکه بیشتر آزمایشـگاه‌های تشخیص طبی از این روش‌های مختلف در کار هر روز خود استفاده می‌نمایند.

ساختار باکتریایی

سیتوپلاسم باکتری‌ها توسط غشـاء سیتوپلاسمی در برگرفته شـده که آن نیز به وسـیله دیواره سلولی متشکل از پپتیدوگلیکان که در باکتری‌های گرم مثبت ضخیم و در گرم منفی‌ها نازک است، پوشـیده شده است. فضای پری پلاسمیک و غشاء خارجی، پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم منفی را احاطه کرده اسـت. در برخی از باکتری‌ها کپسول تمام باکتری را پوشانده است.

ساختارهای سیتوپلاسمی

سیتوپلاسم سلول باکتریایی حاوی DNA کروموزومی، RNA پیامبر (mRNA)، ریبوزوم‌ها، پروتئین‌ها و متابولیت‌ها می‌باشـد (شـکل ۴-۹ را ببینید). برخـلاف یوکاریوت‌ها، کروموزوم باکتری‌ها به صورت منفرد، حلقوی دو رشـته‌ای (Double-stranded Circle) است که در یک هسته قرار ندارد ولی در ناحیه مجزایـی به نام نوکلوئید (Nucleoid) قرار دارند. برخی باکتری‌ها ممکن اسـت دارای دو یا سـه کرومـوزوم حلقوی یـا حتی یک کرومـوزوم خطی منفرد باشند. در باکتری‌ها هیستون‌ها (Histones) برای نگهداری ترکیب DNA، وجود ندارند و DNA نوکلئوزوم‌ها را تشکیل نمی‌هنـد. پلاسـمیدها (Plasmid) کـه DNAهای خارج کروموزومی حلقوی کوچکتر هسـتند نیز ممکن اسـت در باکتری‌ها دیده شوند. پلاسمیدها اگرچه برای بقای سلولی ضروری نیسـتند اما آن‌ها اغلب یـک مزیت انتخابی مانند مقاومت به یک یا چند آنتی بیوتیک را اعطاء می‌نمایند.

فقدان غشاء هسته‌ای احتیاجات و مکانیسم‌های کنترل جهت سـنتز پروتئین را تسهیل می‌کند. بدون غشاء هسته رونویسی و ترجمه همزمان صورت می‌گیرد. به عبارت دیگر ریبوزوم‌هـا می‌توانند به mRNA متصل شـوند و همزمان پروتئین‌ها می‌توانند از روی mRNA سنتز شوند در حالیکه این mRNA هنوز به DNA متصل است.

ریبوزوم باکتریایی از زیـــر واحدهای 50S بعلاوه 30S ســـاخته شده اســـت که با هم یک ریبوزوم 70S را تشکیل می‌دهند. این مشـــابه ریبوزوم 80S(40S+60S) یوکاریوتی نمی‌باشـــد. پروتئین‌ها و RNA ریبـــوزوم باکتریایی به طور قابـــل توجهی با ریبـــوزوم یوکاریوت‌ها متفاوت هســـتند و اهداف اصلی داروهای‌های ضد میکروبی می باشند.

غشاء سیتوپلاسمی باکتری یک ساختار دو لایه لیپیدی (Lipid Bilayer Structure) مانند غشاء یوکاریوت‌ها دارد ولی در غشاء سیتوپلاسمی باکتری، استروئیدها (مانند کلسترول) وجود ندارند. مایکوپلاســـماها از این قانون مستثنی هستند. غشـــاء سیتوپلاسمی باکتری مسئول انجام بسیاری از اعمال مرتبط با ارگانل‌هـــا در یوکاریوت‌ها می‌باشـــد. این وظایف شامل انتقال الکترون (Electron Transport) و تولید انرژی (Energy Production) است که به طور معمول در میتوکندری انجام می‌شود. علاوه بر این، غشاء دارای پروتئین‌های انتقالی که برداشت متابولیت‌ها و آزادسازی مواد دیگر را امکان‌پذیر می‌سازند، پمپ‌های یونی برای نگهداری پتانسیل غشایی و آنزیم‌ها می‌باشند. در بخش داخلی غشاء رشته‌های پروتئینی شبه اکتینی (Actin-like Protein Filaments) وجود دارد که به تعیین شکل باکتری‌ها و محل تشکیل سپتوم (Septum) برای تقســـیم ســـلولی (Cell Division) کمک می‌کنند. در ترپونماها این فیلامنت‌ها شـــکل مارپیچی باکتری را تعیین می‌کنند.

دیواره سلولی

ساختمان (جدول ۲-۹)، ترکیبات و عملکردهای دیواره سلولی (جدول ۳-۹) باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت را از هم افتراق می‌دهند. ترکیبات دیواره سلولی در باکتری‌ها منحصر به فرد هســـتند و ســـاختارهای تکرار شونده آن‌ها به گیرنده‌های الگوی پاتوژن بر روی ســـلول‌های انســـان متصل می‌گردند و پاســـخ ایمنی ذاتی را تحریک می‌کنند. تفاوت‌های مهم در خصوصیات غشـــا در جدول ۴-۹ نشان داده شـــده است. لایه‌های ســـخت پپتیدوگلیکان (مورین (Murein)) غشاءهای سیتوپلاســـمی اغلب پروکاریوت‌ها را احاطه کرده اســـت. ارگانیســـم‌های آرکئـــاً (که دارای گلیکان‌های کاذب (Pseudoglycans) یا مورین‌های کاذب (Pseudomureins) مرتبـــط بـــا پپتیدوگلیکان هســـتند) و مایکوپلاسماها و کلامیدیا (که پپتیدوگلیکان ندارند) در این مورد استثناءها هســـتند. از آنجایی که پپتیدوگلیکان باعث استحکام می‌شود، بنابراین می‌تواند در تعیین نمودن شکل باکتریایی خاص نیز کمک کند. پروتئین‌ها و سایر ملکول‌ها ممکن است به پپتیدوگلیکان متصل باشند.

باکتری‌های گرم مثبت

باکتـــری گرم مثبـــت دارای یک *دیواره ســـلولی چند لایه‌ای و ضخیم اســـت که عمدتـــاً از پپتیدوگلیکان* (-150 500°A) تشـــکیل شده است و غشاء سیتوپلاسمی را احاطه می‌کند (شـــکل ۵-۹). پپتیدوگلیکان یک اسکلت خارجی شـــبکه مانند (Meshlike Exoskeleton) اســـت که از نظر عملکردی شبیه اسکلت خارجی یک حشره است. بر خلاف اسکلت خارجی حشـــره، پپتیدوگلیکان به اندازه کافی منفذ دارد که اجازه انتشـــار متابولیت‌ها را به غشـــاء پلاســـمایی می‌دهد. یک مدل جدید برای پپتیدوگلیکان پیشـــنهاد شده اســـت که در آن گلیکان شبیه شـــاخه‌هایی از غشاء سلولی بیرون زده اســـت و با زنجیره‌هـــای پپتیدی کوتاه اتصالات متقاطع دارد. پپتیدوگلیکان برای ساختار، تکثیر و برای زنده ماندن در شرایط نامساعدی که باکتری در آن رشد می‌نماید ضروری است.

پپتیدوگلیکان می‌تواند توســـط لیزوزیم (Lysozyme) تخریب شود. لیزوزیم آنزیمی است که در اشک و موکوس انســـان وجود دارد ولی توســـط باکتری‌ها و ارگانیسم‌های دیگر نیز تولید می‌شـــود. لیزوزیم ســـتون فقرات گلیکانی پپتیدوگلیکان را تخریب می‌کند. بدون پپتیدوگلیکان، باکتری در اثر اختلاف فشـــار اسمزی در عرض غشاء سیتوپلاسمی متلاشی می‌شود. از بین رفتن دیواره سلولی در باکتری‌های گرم مثبت سبب ایجاد پروتوپلاست (Protoplast) می‌شود که به ســـرعت لیز می‌شود مگر اینکه فشار اسمزی اطراف آن ثابت نگه داشته شود.

دیواره ســـلولی باکتری‌های گرم مثبت ممکن اســـت همچنین شـــامل ترکیبـــات دیگری از قبیـــل پروتئین‌ها، اســـیدهای تایکوئیـــک و لیپوتایکوئیـــک (Teichoic and Lipoteichoic Acids) و پلـــی ســـاکاریدهای کمپلکـــس (معمولاً پلی ساکاریدهای C (C Polysaccharides) نامیده می‌شوند) باشد. پروتئین M در استرپتوکوکوس‌ها و پروتئین

جدول ۲-۹. ساختارهای غشاء باکتریایی

ساختار	ترکیبات شیمیایی	عملکردها
غشای پلاسمایی	فسفولیپیدها، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها	محصور نمودن، تولید انرژی، پتانسیل غشایی و انتقال
دیواره سلولی		
باکتری‌های گرم مثبت		
پپتیدوگلیکان	زنجیره‌های گلیکان حاوی GlcNAc و MurNAc که توسط پل پپتیدی با هم اتصال متقاطع دارند.	شکل و ساختمان سلولی، حفاظت باکتری از شرایط محیطی و کشته شدن به واسطه کمپلمان
تیکوئیک اسید	پلی ریبیتول فسفات یا گلیسرول فسفات که با پپتیدوگلیکان اتصال متقاطع دارد.	تقویت دیواره سلولی، جداسازی یون کلسیم.
اسید لیپوتایکوئیک	تیکوئیک اسید متصل شده به لیپید	فعال‌کننده محافظت‌های ذاتی میزبان
پروتئین‌ها	به صورت کووالانی یا متصل به پپتیدوگلیکان یا اسیدتایکوئیک	فرار از ایمنی، اتصال، غیره
باکتری‌های گرم منفی		
پپتیدوگلیکان	نسخه نازکتر از آنچه در باکتری‌های گرم مثبت مشاهده می‌شود.	شکل و ساختار سلولی
فضای پری پلاسمی	پروتئین‌های انتقال، آنزیم‌ها	آنزیم‌های درگیر در انتقال، سنتز و تجزیه
غشاء خارجی	فسفولیپیدها، Lps، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها	ساختار سلولی، حفاظت در برابر شرایط بدن میزبان
	کانال پورینی	قابل نفوذ برای ملکول‌های کوچک و هیدروفیل، محدودکننده ورود بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها
پروتئین‌ها	سیستم‌های ترشحی (تیپ I تا V)	سوراخ نمودن و ارائه پروتئین‌ها از عرض غشاءها، از جمله وارد نمودن فاکتورهای بیماریزایی
	لیپوپروتئین	غشای خارجی را به پپتیدوگلیکان متصل می‌کند.
LPS	لیپیدA، پلی ساکارید مرکزی و آنتی ژنO	ساختار غشای خارجی، سد حفاظتی، پتانسیل فعالسازی پاسخ‌های ایمنی ذاتی را دارد.
فسفولیپیدها	متشکل از اسیدهای چرب اشباع شده است.	ساختار
سایر ساختارها		
کپسول	پلی ساکاریدها یا پلی پپتیدها (آنتراکس)	ضدفاگوسیتوز
بیوفیلم	پلی‌ساکاریدها	محافظت کلونی باکتری در شرایط محیطی آنتی‌میکروبیال‌ها و پاسخ میزبان
پیلی	پیلین، ادهیسن‌ها	اتصال، پیلی جنسی
تاژک	پروتئین‌های حرکتی (Motor proteins)، فلاژلین	حرکت، کموتاکسی
پروتئین‌ها	پروتئین M استرپتوکوکوس‌ها (به عنوان نمونه)	فرار از ایمنی، اتصال، آنزیم‌ها، غیره

N،GlcNAc- استیل گلوکز آمین؛ LPS، لیپوپلی‌ساکارید؛ N، MurNAC- استیل مورامیک اسید.

جدول ۳-۹. عملکردهای پوشش باکتریایی

عملکرد	ترکیب
ساختار	
سختی	در همه
بسته بندی محتویات درونی	در همه
فعالیت‌های باکتریایی	
سد قابل نفوذ	غشاء خارجی یا غشاء پلاسمایی
جذب متابولیکی	غشاءها و پروتئین‌های انتقالی پری پلاسمیک، پورین‌ها و پرمئازها
تولید انرژی	غشاء پلاسمایی
حرکت	فلاژل
جفت گیری	پیلی
تقابل با میزبان	
اتصال به سلول‌های میزبان	پیلی، پروتئین‌ها، اسید تایکوئیک
شناسایی ایمنی توسط میزبان	تمام ساختارهای بیرونی و پپتیدوگلیکان
فرار از سدهای ایمنی میزبان	
آنتی‌بادی	پروتئین A، کپسول
فاگوسیتوز	کپسول، پروتئین M
کمپلمان	پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم مثبت
ارتباط پزشکی	
اهداف آنتی بیوتیکی	سنتز پپتیدوگلیکان
مقاومت آنتی بیوتیکی	سد غشاء خارجی

A در استافیلوکوکوس اورئوس نیز به صورت کووالانی به پپتید وگلیکان متصل هستند. اسیدهای تایکوئیک پلی‌مرهای آنیونیک محلول در آب (Water-soluble) از پولیول فسفات‌ها (Polyol Phosphates) هستند که به طور کووالان به پپتیدوگلیکان متصل‌اند و برای حیات باکتری ضروری می‌باشند. اسیدهای لیپوتایکوئیک دارای اسید چرب (Fatty Acid) هستند و در غشاء سیتوپلاسمی قلاب شده‌اند. این ملکول‌ها آنتی‌ژن‌های شایع سطحی هستند که تشخیص باکتری از طریق سروتایپینگ را امکان پذیر می‌نمایند و اتصال باکتری‌ها به دیگر باکتری‌ها و نیز به رسپتورهای اختصاصی روی سطح سلول‌های پستانداران (چسبندگی) را تقویت می‌کنند. اسیدهای تایکوئیک فاکتورهای مهم در بیماریزایی هستند. اسیدهای

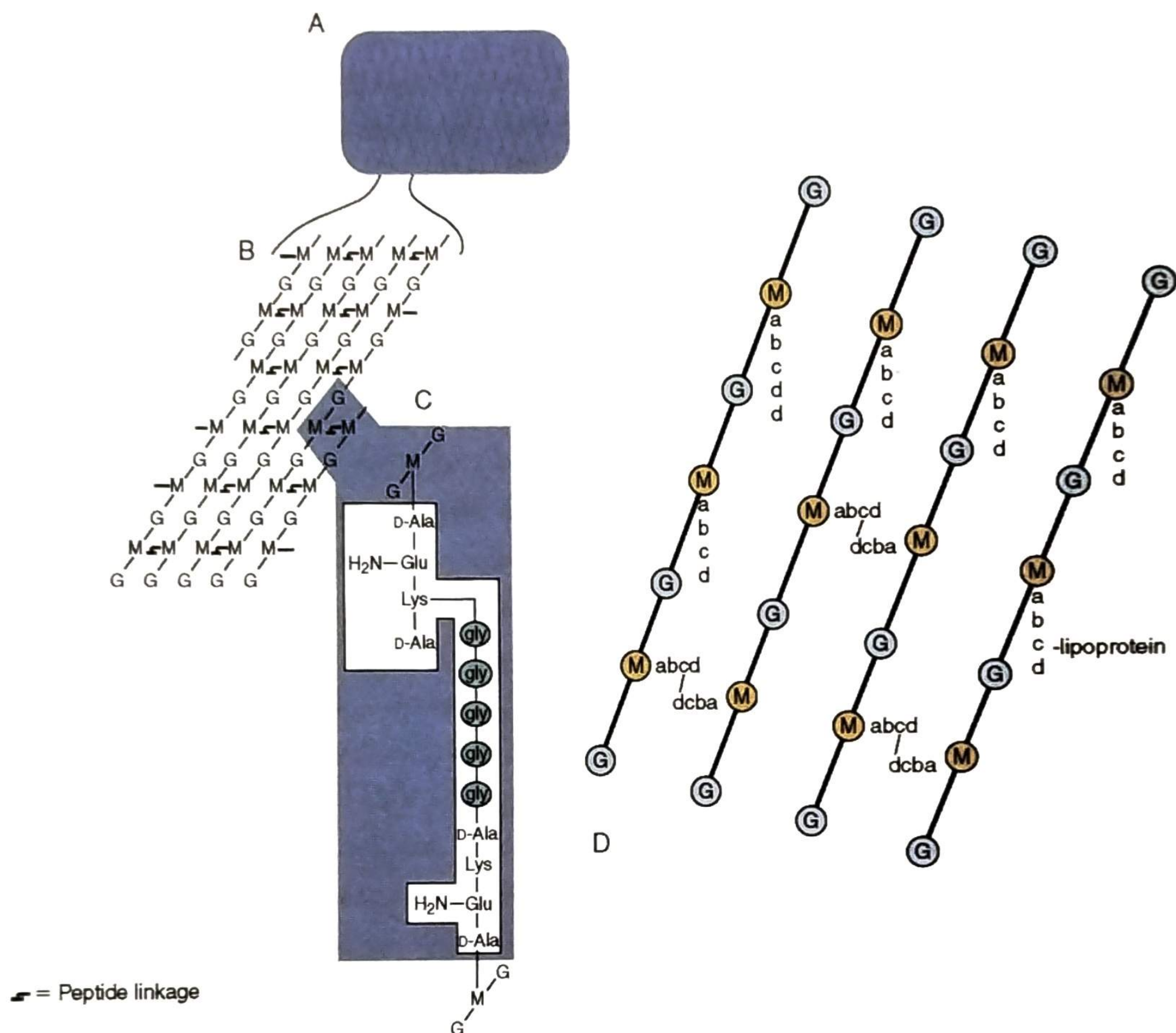
جدول ۴-۹. خصوصیات دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

خصوصیت	گرم مثبت	گرم منفی
غشاء خارجی	−	+
دیواره سلولی	ضخیم‌تر	نازک‌تر
لیپوپلی‌ساکارید	−	+
اندوتوکسین	−	+
تایکوئیک اسید	اغلب وجود دارد	−
اسپورولاسیون	برخی سویه‌ها	−
کپسول	گاهی وجود دارد	گاهی وجود دارد
لیزوزیم	حساس	مقاوم
فعالیت ضد باکتریایی پنی‌سیلین	اغلب حساس	اغلب مقاوم
حساس به خشکی و تخریب فیزیکی	کمتر	بیشتر
تولید اگزوتوکسین	برخی سویه‌ها	برخی سویه‌ها

لیپوتایکوئیک به داخل محیط‌های کشت و نیز میزبان ریخته می‌شوند و به گیرنده‌های الگوی پاتوژن متصل شده و پاسخ‌های محافظتی ذاتی میزبان شبیه اندوتوکسین را، اگرچه ضعیف‌تر، آغاز کنند.

باکتری‌های گرم منفی

دیواره‌های سلولی باکتری‌های گرم منفی از نظر ساختاری و شیمیایی از دیواره‌های سلولی باکتری‌های گرم مثبت پیچیده‌تر هستند (شکل ۲-۹ و ۴-۹ را ببینید). از نظر ساختاری، دیواره سلولی گرم منفی حاوی دو لایه در خارج از غشاء سیتوپلاسمی است. اولین لایه بلافاصله بعد از غشاء سیتوپلاسمی، یک لایه نازک پپتیدوگلیکان است که تنها ۵ تا ۱۰ درصد از وزن دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی را تشکیل می‌دهد. *اسیدهای تایکوئیک* و *لیپوتایکوئیک* در دیواره سلولی گرم منفی وجود ندارد. در خارج از لایه پپتیدوگلیکان، غشاء خارجی (Outer Membrane) وجود دارد که منحصر به باکتری‌های گرم منفی است. فضای بین سطح خارجی غشاء سیتوپلاسمی و سطح داخلی غشاء خارجی، فضای پری پلاسمیک (Priplasmic Space) نامیده می‌شود. این فضا در واقع یک قسمت حاوی ترکیبات سیستم‌های انتقالی جهت انتقال آهن، قند، پروتئین و سایر متابولیت‌ها بوده و دارای آنزیم‌های هیدرولیتیک



شکل ۵-۹. ساختارهای عمومی از ترکیبات پپتیدوگلیکان دیواره سلولی. **A**، پپتیدوگلیکان یک لایه شبکه مانند (Meshlike Layer) در اطراف سلول تشکیل می‌دهد. **B**، شبکه پپتیدوگلیکان از یک پلی مر پلی ساکاریدی تشکیل شده است که توسط پیوندهای پپتیدی اتصالات متقاطع پیدا کرده است. **C**، پپتیدها از طریق پیوند پپتیدی بین D- آلانین انتهایی (D-ala) از یک زنجیره با لیزین (Lys) (یا اسید آمینه دی آمینو دیگری) از زنجیره دیگر با هم اتصال متقاطع دارند. یک پل پنتاگلیسینی (gly_5) این اتصالات متقاطع را در *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد کرده است (نشان داده شده است). **D**، معرفی دوباره ساختار پپتیدوگلیکان اشرشیاکلی. ساختار پپتیدوگلیکان اشرشیاکلی. دی آمینوپیمیلیک اسید، اسید آمینه دی آمینو در موقعیت سوم پپتید است که مستقیما به آلانین انتهایی زنجیره دیگر توسط پیوند عرضی متصل می‌شود. لیپوپروتئین غشاء خارجی را به پپتیدوگلیکان متصل می‌کند. G، N-استیل گلوکز آمین، Glu، D-گلوتامیک اسید، gly، گلیسین، M، لیگ لایزین (lyglysine)، N استیل مورامیک اسید.

مختلف می‌باشد که جهت تجزیه ماکروملکول‌های بزرگ برای متابولیسم سلول مهمّ می‌باشند. این آنزیم‌ها معمولا شامل پروتئازها، فسفاتازها، لیپازها، نوکلئازها و آنزیم‌های تجزیه کننده کربوهیدرات‌ها می‌باشند. در مورد گونه‌های پاتوژن باکتری‌های گرم منفی، تعداد زیادی از فاکتورهای ویرولانس کشنده مانند کلاژنازها، هیالورونیدازها، پروتئازها و بتالاکتاماز، در فضای پری پلاسمیک وجود دارند.

دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی توسط سیستم‌های انتقالی مختلف مقطع می‌شود که مکانیسم‌های جهت جذب و آزادسازی متابولیت‌های مختلف و دیگر ترکیبات را فراهم می‌سازند. غشاءها همچنین توسط سیستم‌های ترشحی تیپ I تا V مقطع می‌شوند. تولید سیستم‌های ترشحی ممکن است در طی عفونت القاء شود و از طریق انتقال ملکول‌های تسهیل‌کننده اتصال و یا ملکول‌های تسهیل‌کننده رشد

درون‌سلولی، در بیماریزایی همکاری کنند. سیستم ترشحی تیپ III یک فاکتور ویرولانس بزرگ برای بعضی از باکتری‌هاست که با یک ساختار پیچیده هم از غشاء داخلی و هم غشاء خارجی عبور می‌کند و مانند یک سرنگ پروتئین‌ها را به درون دیگر سلول‌های باکتریایی و انسانی تزریق می‌نماید (شکل ۲-۱۱ را ببینید).

همان طور که قبلا ذکر شد، غشاءهای خارجی (شکل ۲-۹ را ببینید) منحصر به باکتری‌های گرم منفی است. غشاء خارجی مانند یک کیسه پرده ای محکم اطراف باکتری‌ها است. *غشاء خارجی ساختار باکتری را حفظ می‌کند و سدی نفوذپذیر برای ملکول‌های بزرگ* (مانند پروتئین‌ها از قبیل لیزوزیم) و *ملکول‌های هیدروفوب* (مانند بعضی از مواد ضد میکروبی) می‌باشد. این غشاء همچنین باکتری‌ها را در برابر شرایط نامساعد محیطی مانند دستگاه گوارش میزبان (با اهمیت برای ارگانیسم‌های انتروباکتریاسیه) حفظ می‌کند. غشاء خارجی یک ساختمان دو لایه نامتقارن است که با همه غشاهای بیولوژی دیگر از نظر ساختار لایه خارجی‌اش متفاوت است. لایه داخلی حاوی فسفولیپیدهایی است که به طور طبیعی در غشاءهای باکتری‌ها دیده می‌شوند. به هر حال لایه خارجی عمدتاً از لیپوپلی ساکارید (LPS) ساخته شده است. به جز آن گروه از ملکول‌های LPS که در فرایند سنتز نقش دارند، لایه بیرونی غشاء خارجی تنها جایگاهی است که ملکول‌های LPS یافت می‌شوند.

LPS همچنین اندوتوکسین (Endotoxin) نامیده می‌شود و یک تحریک کننده قدرتمند پاسخ‌های ایمنی و ذاتی است. LPS از باکتری‌ها به درون محیط و میزبان می‌ریزد. LPS سلول‌های B را فعال می‌کند و ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک و سایر سلول‌ها را وادار به آزادسازی اینترلوکین-۱ ، اینترلوکین-۶ ، فاکتورنکروز دهنده توموری و دیگر فاکتورها می نماید. LPS باعث ایجاد تب می‌شود و می‌تواند شوک نیز ایجاد کند. واکنش شوارتزمن (Shwartzman Reaction) (انعقاد درون رگی منتشر) به دنبال آزاد شدن مقدار زیادی LPS به درون جریان خون ایجاد می‌شود. باکتری نایسریا مقدار زیادی از یک ترکیب مرتبط به نام لیپوالیگوساکارید (LOS)، را به درون محیط می‌ریزد که منجر به ایجاد تب و علائم شدید می‌گردد.

تنوع پروتئین‌هایی که در غشاءهای خارجی باکتری‌های گرم منفی وجود دارد محدود است، اما تعدادی از پروتئین‌ها در غلظت بالا وجود دارند که باعث می‌شوند محتوای کلی پروتئین‌های این غشاء از غشاء سیتوپلاسمی بیشتر باشد. بسیاری از پروتئین‌ها در عرض تمام دو لایه لیپیدی قرار دارند و بنابراین جزء پروتئین‌های انتقالی محسوب می‌شوند. یک گروهی از این پروتئین‌ها به عنوان پورین‌ها (Porins) نامیده می‌شوند زیرا آن‌ها منافذی را ایجاد می‌کنند که اجازه انتشار ملکول‌های هیدروفیل با اندازه کمتر از ۷۰۰ دالتون را از بین غشا می‌دهند. *کانال پورینی به متابولیت‌ها و مواد ضدمیکروبی هیدروفیل کوچک اجازه عبور می‌دهد.* غشاء خارجی همچنین دارای پروتئین‌های ساختمانی و ملکول‌های رسپتور برای باکتریوفاژها (Bacteriophages) و دیگر لیگاندها و ترکیبات انتقالی و سیستم‌های ترشحی است.

غشاء خارجی در مکان‌های اتصال (Adhesion Sites) به غشاء سیتوپلاسمی متصل می‌شود و توسط لیپوپروتئین (Lipoprotein) به پپتیدوگلیکان متصل می‌گردد. لیپوپروتئین از طریق پیوند کووالان به پپتیدوگلیکان اتصال می‌یابد و از طرف دیگر هم محکم به غشاء خارجی متصل می‌گردد. مکان‌های چسبندگی یک مسیر غشایی را برای آزادسازی ترکیبات غشاء خارجی تازه سنتز شده را به غشاء خارجی فراهم می‌کنند.

غشاء خارجی توسط اتصال کاتیون‌های دو ظرفیتی (Ca^{+2} ،Mg^{+2}) بین فسفات‌ها و ملکول‌های LPS و نیروهای هیدروفوبی بین LPS و پروتئین‌ها، کنار هم نگه داشته می‌شود. این ارتباطات متقابل یک غشاء سفت و محکمی را ایجاد می‌کنند که می‌تواند توسط آنتی بیوتیک‌ها (مانند پلی میکسین) یا به وسیله برداشت یون‌های Mg و Ca (برداشت (Chelation) به وسیله اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) یا تتراسایکلین (Tetracycline)) مختل گردد. تخریب غشاء خارجی، باکتری را ضعیف می‌کند و باعث تراوش ملکول‌های بزرگ هیدروفوب می‌شود. اضافه کردن لیزوزیم به سلول‌هایی که غشاهای خارجی خود را از دست داده‌اند باعث ایجاد اسفروپلاست‌ها (Spheroplasts) می‌شود که همانند پروتوپلاست‌ها در برابر شرایط اسمزی حساس هستند

ساختارهای خارجی

برخی از باکتری‌ها (گرم مثبت یا گرم منفی) توسط لایه‌های پلی ساکاریدی یا پروتئینی سست به نام کپسول‌ها (Capsules) احاطه شده‌اند. در مواردی نیز تحت عنوان لایه لعابی (Slime Layer) یا گلیکوکالیکس (Glycocalyx) نیز نامیده می‌شوند. *باسیلوس آنتراسیس* یک استثناء در این قانون است زیرا یک کپسول پلی پپتیدی (Polypeptide Capsule) تولید می‌کند. کپسول به سختی توسط میکروسکوپ دیده می‌شود ولی توسط رسوب ذرات جوهر هندی (India Ink) قابل مشاهده است.

کپسول‌ها برای رشد باکتری‌ها ضروری نیستند ولی برای بقاء باکتری در میزبان بسیار مهم می‌باشند. *کپسول خاصیت آنتی‌ژنی و ضد فاگوسیتی ضعیفی دارد و فاکتور بیماریزایی عمده است (مثلا در استرپتوکوکوس پنومونیه)*. کپسول همچنین می‌تواند به عنوان سدی در برابر ملکول‌های هیدروفوبیک توکسیک از قبیل مواد پاک کننده عمل نموده و سبب افزایش چسبیدن به باکتری‌های دیگر و یا سطوح بافت میزبان شود. در استرپتوکوکوس موتانس کپسول‌های دکستران (Dextran) و لوان (Levan) راهکارهایی جهت اتصال و چسبندگی باکتری به مینای دندان هستند. سویه‌های باکتریایی فاقد کپسول ممکن است در طی رشد طولانی مدت باکتری در شرایط آزمایشگاهی به دور از فشارهای انتخابی بدن میزبان ایجاد گردند و بنابراین بیماریزایی کمتری دارند. برخی از باکتری‌ها (مانند *پسودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) وقتی تعداد باکتری‌ها کافی باشد (کوئوروم (guorum)) و شرایطی که رشد آن‌ها را حمایت می‌کند، وجود داشته باشد، یک بیوفیلم پلی ساکاریدی (Polysaccharide Biofilm) تولید می‌کنند که باعث تثبیت یک اجتماع باکتریایی و حفاظت باکتری در برابر سیستم دفاعی بدن میزبان و آنتی بیوتیک‌ها می‌شود. مثال دیگری از بیوفیلم، پلاک دندانی می‌باشد که توسط *استرپتوکوکوس موتانس* ایجاد می‌شود.

فلاژل‌ها (Flagella) رشته‌هایی طناب مانند (ropelike) هستند که از زیر واحدهای پروتئینی حلقوی مارپیچی به نام فلاژلین (Flagellin) ساخته شده اند. فلاژل در غشاهای باکتریایی از طریق ساختارهای قلاب (Hook) و جسم پایه‌ای (Basal Body) محکم شده و توسط پتانسیل غشایی به حرکت در می‌آید. گونه‌های باکتریایی ممکن است یک یا چندین فلاژل روی سطح خود داشته باشند و این فلاژل‌ها ممکن است در قسمت‌های مختلفی از سلول قرار گرفته باشند. پتانسیل غشایی به پروتئین موتور نیرو می‌بخشد که در نتیجه قسمت قدامی شلاق‌مانند متشکل از چندین زیرواحد فلاژلین را به چرخش می‌اندازد. فلاژل باعث ایجاد حرکت در باکتری‌ها می‌شود که باکتری‌ها بتوانند به سمت غذا حرکت کنند (کموتاکسی (Chemotaxis)) و یا از سموم فرار کنند. باکتری‌ها برای نزدیک شدن به مواد غذایی ابتدا به طور مستقیم حرکت می‌کنند و سپس با غلتیدن در یک مسیر جدید قرار می‌گیرند. مدت زمان این حرکت با افزایش غلظت ماده جاذب شیمیایی (Chemoattractant) طولانی‌تر می‌شود. جهت چرخش فلاژل تعیین کننده خزیدن یا غلتیدن باکتری است. فلاژل همچنین دارای خاصیت آنتی‌ژنی است و در تعیین سویه کاربرد دارد و یک لیگاند برای گیرنده الگوی پاتوژن به منظور فعالسازی ایمنی ذاتی می‌باشند.

فیمبریه (Fimbriae) (پیلی (Pili)) (در زبان لاتین به معنی ریشه است) ساختارهای مویی شکل هستند که روی سطح خارجی باکتری قرار گرفته اند و از زیر واحدهای پروتئینی به نام پیلین (Pilin) ساخته شده اند. پیلی را می‌توان از لحاظ مورفولوژیکی از فلاژل افتراق داد. زیرا پیلی‌ها قطر کوتاه‌تری دارند (۳ تا ۸ نانومتر در برابر ۱۵ تا ۲۰ نانومتر) و معمولا ساختار مارپیچی ندارند. معمولاً چند صد فیمبریه به صورت پری تریش (یکنواخت) در تمام سطح سلول باکتری قرار گرفته‌اند. آن‌ها ممکن است حدود ۱۵ تا ۲۰ میکرومتر طول داشته باشند یا چندین برابر طویل‌تر از طول سلول باشند.

فیمبریه اتصال باکتری به دیگر باکتری‌ها یا به سلول میزبان را تقویت می‌کند (نام‌های دیگر آن ادهسین‌ها (Adhesins)، لکتین‌ها (Lectins)، *اواسین‌ها* (Evasins) و *اگرسین‌ها* (Aggressins) هستند). نوک فیمبریه ممکن است حاوی پروتئین‌هایی (لکتین‌ها (lectins)) باشد که به قندهای خاصی (مانند مانوز) متصل می‌شود. پیلی به عنوان یک فاکتور چسبندگی (Adhesin) یک فاکتور بیماریزایی مهم برای کلونیزاسیون و عفونت دستگاه ادراری ناشی از *اشریشیاکلی*، *نایسریا گونوره* و سایر باکتری‌ها می‌باشد.

پیلی F (پیلی جنسی (Sex Pili)) به سایر باکتری‌ها متصل می‌شود و یک کانالی است که انتقال قطعات بزرگ کروموزوم‌های باکتریایی را در بین باکتری‌ها امکان‌پذیر می‌نماید. این پیلی‌ها توسط یک پلاسمید (F) کد می‌شوند.

باکتری‌های دارای ساختارهای دیواره سلولی جایگزین

مایکوباکتریوم‌ها یک لایه پپتیدوگلیکانی (با اختلاف ساختاری اندک) دارند که در هم پیچیده شده است و توسط پیوند کووالان به پلی مر آرابینوگالاکتان (Arabinogalactan) متصل می‌شود و به وسیله یک پوشش لیپیدی موم مانند از اسید مایکولیک (اسیدهای چرب β- هیدروکسی طویل با شاخه‌های α)، فاکتور طنابی (گلیکولیپیدی از ترهالوز و دو اسید مایکولیک)، واکس D (گلیکولیپیدی شامل ۱۵ تا ۲۰ اسید مایکولیک و قند) و سولفولیپیدها، احاطه شده است (شکل C ۲-۹ را ببینید). این باکتری‌ها به عنوان اسید - فاست (Acid-fast) شناخته می‌شوند. پوشش این باکتری مسئول بیماریزایی است و ضد فاگوسیت می‌باشد. ارگانیسم‌های کورینه باکتریوم (*Corynebacterium*) و نوکاردیا (*Nocardia*) نیز لیپیدهای اسید مایکولیک تولید می‌کنند. مایکوپلاسماها فاقد پپتیدوگلیکان دیواره سلولی هستند و استروئیدها را از میزبان در درون غشاءهای خود قرار می‌دهند.

ساختمان و بیوسنتز اجزای مهم دیواره سلولی باکتریایی

ترکیبات دیواره سلولی ساختارهای بزرگی هستند که از پلیمریزاسیون زیر واحدها ساخته می‌شوند. این نوع ساختار سنتز آن‌ها را تسهیل می‌کند. همانند فضانوردان سازنده یک ایستگاه فضایی، باکتری‌ها جهت گردهم‌آوری دیواره‌های سلولی خود با مشکلاتی روبرو هستند. سنتز پپتیدوگلیکان، LPS، تایکوئیک اسید و کپسول بر روی سطح باکتری و به دور از دستگاه سنتزی و منبع انرژی سیتوپلاسمی و در یک شرایط نامساعد رخ می‌دهد. هم برای ایستگاه فضایی و هم برای باکتری‌ها، پیش‌سازهای اولیه و زیر واحدهای ساختاری در داخل باکتری در یک مکان شبیه به کارخانه دور هم جمع می‌شوند و توسط ساختمانی شبیه به یک کمربند انتقالی (Conveyor Belt) به روی سطح باکتری برده می‌شوند و سپس به ساختارهای از پیش موجود متصل می‌گردند. پیش سازهای اولیه همچنین باید توسط پیوندهای پرانرژی (مانند فسفات‌ها) یا وسایل دیگری که واکنش‌های اتصالی در حال انجام در خارج سلول باکتری را تقویت می‌کنند، فعال شوند.

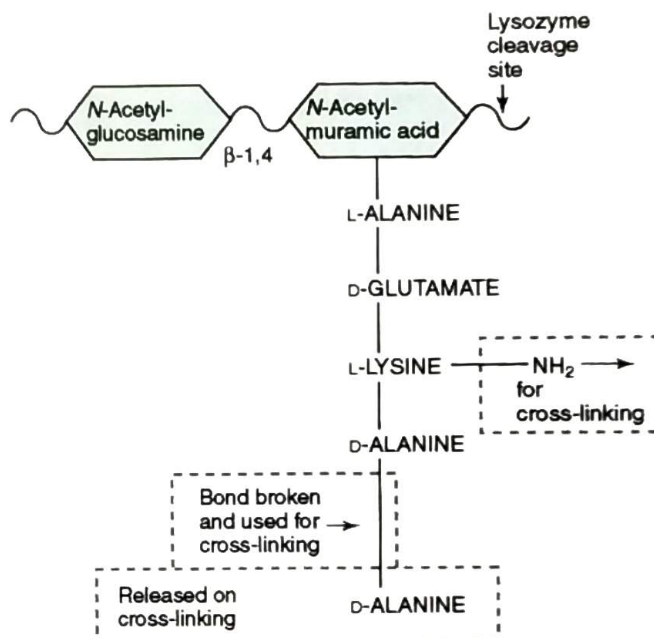
پپتیدوگلیکان (موکوپپتید، مورین)

پپتیدوگلیکان ساختمان محکمی است که از زنجیره‌های خطی پلی ساکاریدی که با پپتیدها اتصال متقاطع دارند، ساخته شده است. قسمت پلی ساکاریدی از واحدهای دی ساکاریدی تکراری از N استیل گلوکز آمین (GlcNAc، NAG، GM) و N استیل مورامیک اسید (MurNAC، NAM، M) ساخته شده است (شکل ۵-۹ و شکل ۶-۹ را ببینید).

یک تتراپپتید به MurNAc متصل شده است. این پپتید غیر معمول است زیرا حاوی هر دو نوع اسیدهای آمینه L و D است (اسیدهای آمینه D به طور معمول در طبیعت استفاده نمی‌شوند) و این پپتید به جای اینکه توسط ریبوزوم ساخته شود به طور آنزیماتیک (Enzymatically) ساخته می‌شود. دو اسیدآمینه اول متصل شونده به ان استیل مورامیک اسید ممکن است در ارگانیسم‌های مختلف متفاوت باشند.

اسیدهای آمینه دی آمینو (diamino) در موقعیت سوم برای اتصال عرضی زنجیره پپتیدوگلیکان ضروری هستند. اسیدهای آمینه دی آمینو عبارتند از: لیزین (Lysine)، اسیدهای دی آمینو پیمیلیک (Diaminopimelic) و دی آمینو بوتیریک (Diaminobutyric). اتصال عرضی پپتیدی (Peptide Cross-link) بین آمین آزاد اسیدآمینه آمینو و D – آلانین در موقعیت چهارم زنجیره دیگر شکل می‌گیرد. استافیلوکوکوس اورئوس و دیگر باکتری‌های گرم مثبت از یک پل آمینواسیدی (مثلاً یک پپتید پنتاگلیسینی [$glycine_5$ peptide]) بین این اسیدهای آمینه استفاده می‌کنند تا اتصال متقاطع را طویل نمایند. فرم پیش ساز پپتید یک D- آلانین اضافی دارد که در طی مرحله اتصال متقاطع آزاد می‌گردد.

پپتیدوگلیکان در باکتری‌های گرم مثبت چندین لایه را تشکیل می‌دهد و اغلب در سه بعد اتصالات عرضی دارد که



شکل ۶-۹. پیش ساز پپتیدوگلیکان. پپتیدوگلیکان از واحدهای پیش ساخته‌ای که حاوی پنتاپپتید متصل به N- استیل مورامیک اسید است تشکیل می‌شود. پنتاپپتید دارای یک واحد D- آلانین- D-آلانیـــن انتهایــی (Terminal D-alanine-D-alanine Unit) اســت. این دی پپتید برای ایجاد اتصــال عرضی پپتیدوگلیکان ضروری اســت و در واقع هدف حمله آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام و ونکومایسین می‌باشد. پیوند دی‌ساکاریدی β (1-4) که توسط آنزیم لیزوزیم شکسته می‌شود، نشان داده شده است.

باعث ایجاد یک دیواره سلولی خیلی سفت و محکم می‌شود. بر عکس، پپتیدوگلیکان در دیواره‌های سلولی گرم منفی معمولاً یک ملکول (لایه) ضخیم اســت. تعداد اتصالات عرضی و طول این اتصالات ســختی شــبکه پپتیدوگلیکان را تعیین می‌نماینــد. محلی که لیزوزیم (Lysozyme) گلیکان را در پپتیدوگلیکان می‌شکنند در شکل ۶-۹ نشان داده شده است.

سنتز پپتیدوگلیکان

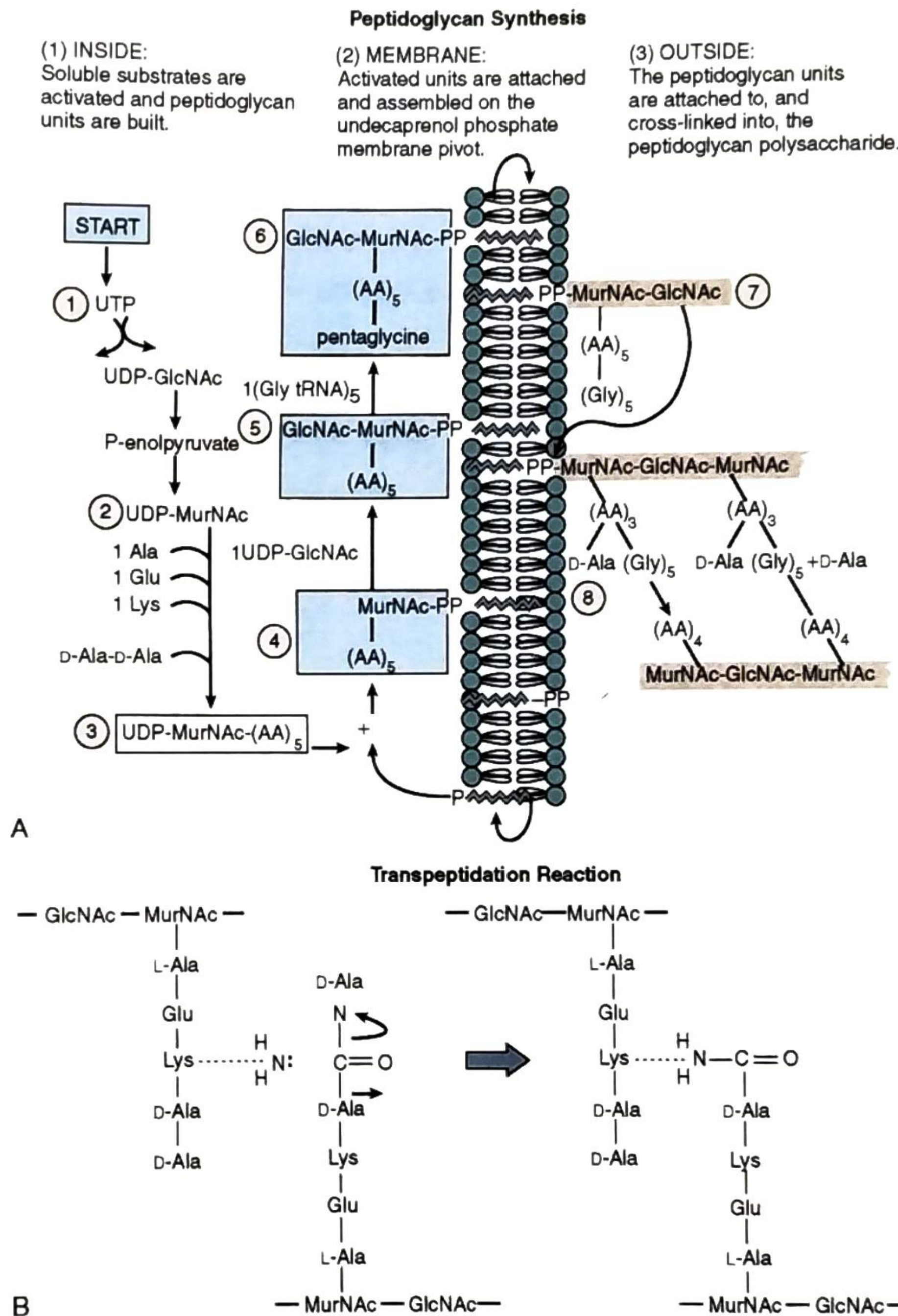
ســنتز پپتیدوگلیکان در چهــار مرحله صورت می‌گیرد (شــکل ۷-۹). ابتدا، پیش‌ســازها در درون سلول سنتز و فعال می‌شــوند. گلوگز آمیــن (Glucosamine) به صورت آنزیماتیک به Mur NAC تبدیل می‌شــود و سپس توسط واکنش با یوریدین تری فسفات (UTP) از نظر انرژی فعال می‌شــود تا به یوریدین دی فسفات - N- استیل مورامیک اســید (UDP- MurNAC) تبدیل شــود. سپس پیش ساز UDP-MurNAC-Pentapeptide در یــک ســری مراحل آنزیماتیک تجمع می‌یابد.

در مرحلــه دوم، UDP-MurNAc-Pentapeptide در غشــاء سیتوپلاســمی از طریق یک پیوند پیروفسفاتی به ساختار شبه کمربند اتصالی ملکولی تحت عنوان باکتوپرنول (آندکاپرنــول (undecaprenol [C_{55} isoprenoid])) متصــل می‌شــود و یوریدین منــو فســفات (UMP) آزاد می‌شــود. GlcNAC نیز جهت ساختن قالب دی ساکاریدی پپتیدوگلیکان اضافه می‌شــود. در برخی از باکتری‌ها (مانند *اســتافیلوکوکوس اورئــوس*) جهت طویل ســازی اتصال، زنجیره پنتاگلیســینی یا زنجیره دیگری به اســیدآمینه دی آمینو در موقعیت سوم زنجیره پپتیدی اضافه می‌گردد.

در مرحله ســوم ملکول‌های باکتوپرنول، پیش ساز دی ساکارید: پنتاپپتید را توسط آنزیم فلیپاز (flippase enzyme) به سطح بیرونی غشاء سلول منتقل می‌کنند.

در مرحله آخر، پپتیدوگلیکان در ســطح خارجی غشای پلاســمایی گســترش می‌یابد. دی ســاکارید -GlcNAc MurNAc بــا اســتفاده از پیونــد پیروفســفات بین خود و باکتوپرنــول بــه عنوان تأمیــن کننده انــرژی واکنش آنزیم‌هایی که ترانس گلیکوزیــلاز (Transglycosylase) نامیده می‌شــوند به زنجیره پپتیدوگلیکان متصل می‌شود. پیروفســفوباکتوپرنول به فســفو باکتوپرنول تبدیل شده و حلقوی می‌شود. باسیتراسین (Bacitracin) از این حلقوی شــدن (Recycling) ممانعت می‌کند. زنجیره‌های پپتیدی از زنجیره‌هــای گلیکان مجاور با یکدیگر به وســیله تبادل پیوند پپتیدی (ترانس پپتیداسیون (Transpeptidation)) بین آمین آزاد اســید آمینه موجود در موقعیت سوم پنتاپپتید (مانند لیزین) یا انتهای آمینی زنجیره پنتاگلیســینی متصل و D-آلانیــن در موقعیت چهــارم دیگر زنجیــره پپتیدی اتصال متقاطــع برقرار می‌گردد که در نتیجه آن D-آلانین انتهایی (Terminal D-alanine) از پیش ساز آزاد می‌گردد. این مرحله نیاز به هیــچ انرژی اضافی ندارد زیرا پیوندهای پپتیدی مبادله می‌شوند.

واکنش اتصال عرضی توسط ترانس پپتدازهای متصل بــه غشــاء (Membrane-bound Transpeptidases) کاتالیز می‌شــود. آنزیم‌هــای مرتبط نظیر D-کربوکســی پپتیداز (D-carboxypeptidases) به منظور محدود نمودن گســترش اتصال متقاطع، D- آلانین‌های انتهایی آزاد را بر



شکل ۷-۹. سنتز پپتیدوگلیکان. **A**، سنتز پپتیدوگلیکان در سه مرحله متوالی رخ می‌دهد: (۱) پپتیدوگلیکان از واحدهای از پیش ساخته سنتز می‌شود و برای تجمع و انتقال به درون سلول فعال می‌شود. (۲) در غشاء واحدها روی کمربند انتقالی اندوکاپرنول فسفات جمع می‌شوند و بدین ترتیب پیش ساز تکمیل می‌شود. (۳) این واحد به خارج سلول انتقال داده می‌شود (۴) و در آن‌جا به زنجیره پلی ساکاریدی متصل می‌شود و نهایت پل عرضی پپتیدی تشکیل می‌شود. *استافیلوکوکوس اورئوس* از پل پنتاگلیسینی برای ایجاد اتصالات عرضی استفاده می‌کند. همانند یک ساختمان می‌تواند با یک جایگاه فضایی مقایسه شود. **B**، واکنش پیوند عرضی یک ترانس پتپیداسیون است. *اشرشیاکلی* از یک اتصال مستقیم بین D–آلانین و لیزین برای ایجاد پیوند عرضی استفاده می‌کند. یک پیوند پپتیدی (در داخل سلول ایجاد می‌شود) با دیگری (در خارج از سلول) مبادله می‌شود و طی آن D–آلانین رها می‌شود. آنزیم‌هایی که این واکنش را کاتالیز می‌کنند D–آلانین–D–آلانین ترانس پپتیداز–کربوکسی پپتیدازها (D-alanine-D-alanine Transpeptidase-carboxypeptidases) نامیده می‌شوند. این آنزیم‌ها اهداف آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بوده و به نام پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین (Penicillin-binding Proteins) نامیده می‌شوند. AA5، پنتاپپتید با ساختار D-Ala - D-Ala انتهایی؛ AA4، تتراپپتید با ساختار D-Ala انتهایی؛ gly5، پنتاپپتید گلیسینی: Glu، گلوتامات؛ Lys، لیزین؛ MurNAc-PP، N– استیل مورامیک اسید دی فسفات؛ tRNA، ریبونوکلئیک اسید انتقالی؛ UDP- GlcNAc، یوریدین دی فسفات N–استیل گلوکز آمین؛ UDP-MurNAc، یوریدین دی فسفات N-استیل مورامیک اسید؛ UTP، یوریدین تری فسفات.

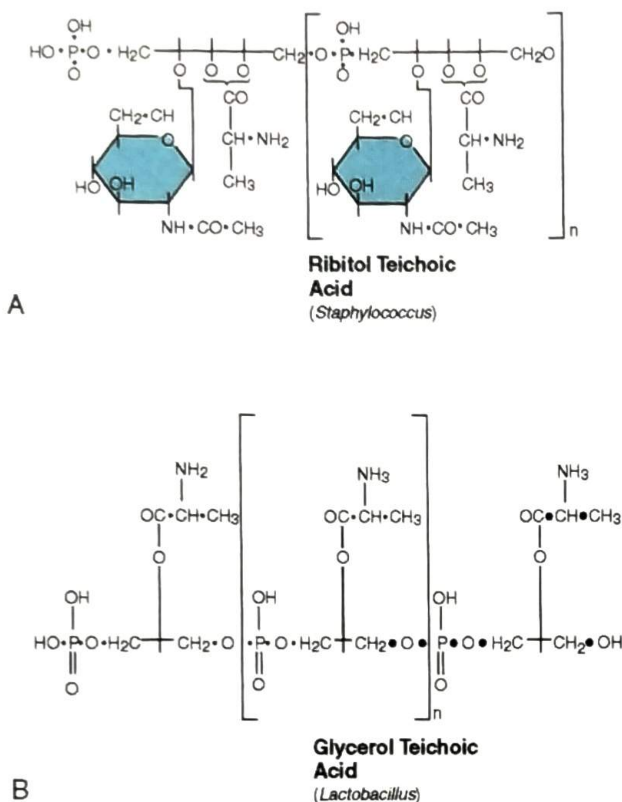
می‌دارند. ترانس پپتیدازها (Transpeptidases) و کربوکسی پپتیدازها (carboxypeptidases) پروتئین‌های متصل شونده به پروتئین ((Penicillin-binding Proteins (PBPs)) نامیده می‌شوند. زیرا این آنزیم‌ها اهداف حمله پنی‌سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام هستند. پنی‌سیلین و آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام مرتبط وقتی به این آنزیم‌ها متصل می‌شوند شبیه آرایش فضایی سوبسترای D-آلانین-D-آلانین (D-ALa-D-ALa) می‌شوند. ونکومایسین (Vancomycin) به ساختار D-آلانین-D- آلانین متصل می‌شود تا از این واکنش‌ها جلوگیری کند. PBPهای مختلف برای گسترش پپتیدوگلیکان، ایجاد دیواره (Septum) جهت تقسیم سلول و خمیدگی شبکه پپتیدوگلیکان (شکل سلول) استفاده می‌شوند. گسترش پپتیدوگلیکان و اتصال متقاطع برای رشد و تقسیم سلول ضروری است.

پپتیدوگلیکان به طور ثابت سنتز و تخریب می‌شود. اتولیزین‌ها (Autolysins) از قبیل لیزوزیم (Lysozyme) در تعیین شکل باکتری مهم هستند. مهار سنتز یا ایجاد اتصال عرضی پپتیدوگلیکان اتولیزین‌ها را متوقف نمی‌کند و فعالیت آن‌ها شبکه را تضعیف نموده و منجر به لیز سلولی و مرگ می‌شود. سنتز پپتیدوگلیکان جدید در شرایط فقر غذایی (Starvation) انجام نمی‌شود که این مسئله منجر به سستی پپتیدوگلیکان و از دست رفتن اطمینان رنگ‌آمیزی گرم می‌شود.

شناخت بیوسنتز پپتیدوگلیکان در پزشکی ضروری است زیرا این واکنش‌ها منحصر به سلول‌های باکتریایی هستند و از اینرو می‌توان با اثر جانبی اندک یا بدون هیچ اثر جانبی روی سلول‌های میزبان (انسان) این واکنش‌ها را متوقف کرد. همانطور که قبلا نشان داده شد تعدادی از آنتی بیوتیک‌ها یک یا بیشتر از یک مرحله را در این مسیر مورد هدف قرار می‌دهند (فصل ۱۴ را ببینید).

تایکوئیک اسید

تایکوئیک اسید (Teichoic Acid) و لیپوتایکوئیک اسید (Lipoteichoic Acid) پلیمرهای ریبوز یا گلسیرول تغییر یافته از نظر شیمیایی‌اند که توسط فسفات‌ها به هم متصل می‌شوند (شکل ۸-۹). قندها، کولین یا D-آلانین ممکن است به هیدروکسیل‌هایی از ریبوز یا گلیسرول متصل شوند و شاخص‌های آنتی ژنیک را ایجاد کنند. این



شکل ۸-۹. تایکوئیک اسید. تایکوئیک اسید پلیمری از ریبیتول (Ribitol) **(A)** یا گلیسرول فسفات **(B)** تغییر یافته از نظر شیمیایی است. نحوه این تغییر (مانند قندها، اسیدهای آمینه) می‌تواند سروتیپ باکتری را تعیین کند. تایکوئیک اسید از طریق پیوند کووالان به پپتیدوگلیکان متصل شود. لیپوتایکوئیک اسید از طریق پیوند کووالان اسید چرب به غشاء سیتوپلاسمی متصل می‌شود.

شاخص‌های آنتی‌ژنیک توسط آنتی بادی‌ها شناسایی می‌شوند و ممکن است سروتیپ باکتری را تعیین کنند. لیپوتایکوئیک اسید دارای اسید چرب بوده و در غشاء لنگر انداخته است. تایکوئیک اسید به کمک باکتوپرنول (Bactoprenol) از بلوک‌های ساختمانی در روشی مشابه سنتز پپتیدوگلیکان ساخته می‌شود. تایکوئیک اسید توسط فرایند آنزیمی به N-ترمینال (N-terminus) پپتید پپتیدوگلیکان متصل می‌گردد و همچنین از سلول‌ها ترشح می‌شود.

لیپوپلی ساکارید

LPS (اندوتوکسین (Endotoxin)) از سه بخش ساختاری تشکیل شده است: لیپید A (Lipid A) ، پلی ساکارید مرکزی (بخش مرکزی خشن) و آنتی ژن O

LPS
Repeat units (up to 40) | O antigen
Core | Core polysaccharide
Disaccharide-diphosphate
Fatty acids | Lipid A
A

Repeat unit: O antigen
Example: (repeated up to 40 times)
Mannose–Abequose
Rhamnose
Galactose
B

Core
Glu-GlcNAc
Gal
Glu-Gal
Hep
Hep-P-P-Eth-N
KDO
KDO-KDO-P-Eth-N
C

KDO	= Keto-deoxy-octanoate
Hep	= L-Glycero-D-mannoheptose
HM	= Beta-hydroxymyristic acid (C_{14})
LM	= Lauroxymyristic acid
MM	= Myristoxymyristic acid
Eth-N	= Ethanolamine
Glu	= Glucose
GlcNAc	= *N*-Acetylglucosamine
Gal	= Galactose
P	= Phosphate

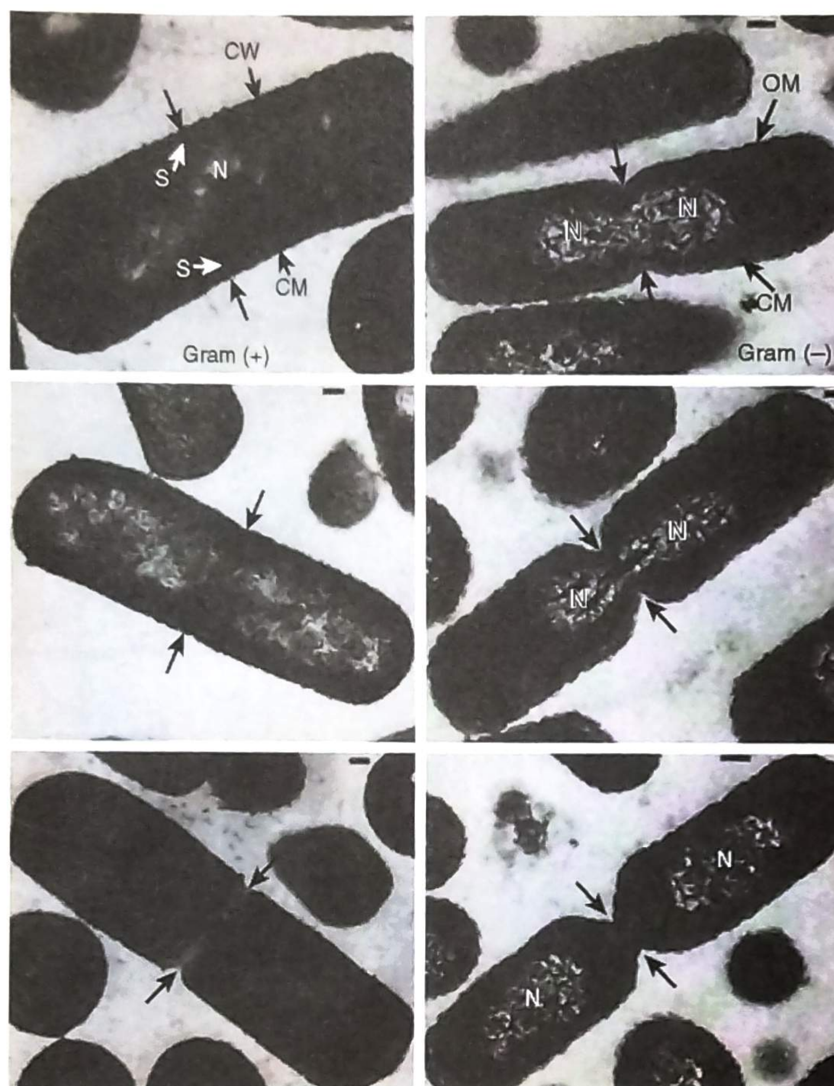
Lipid A
CORE
D (MM) (LM) (HM) (HM)

شکل ۹-۹. لیپوپلی ساکارید (LPS) پوشش باکتری‌های گرم منفی. **A**، قطعات پلیمر نشان دهنده آرایش ساختار اصلی است. هر ملکول LPS یک لیپید A، یک واحد پلی ساکارید مرکزی و چند واحد تکرای آنتی‌ژن O دارد. **B**، واحد تکراری آنتی‌ژن O تیپیک (*سالمونلا تایفی موریوم*)، **C**، پلی ساکارید مرکزی **D**، ساختار لیپید A *سالمونلا تایفی موریوم*.

(O Antigen) (شکل ۹-۹). لیپید A ترکیب پایه‌ای LPS است و برای حیات باکتری ضروری است. لیپید A مسئول فعالیت اندوتوکسینی LPS است. لیپید A یک اسکلت دی ساکارید گلوگز آمین فسفریله شده (Phosphorylated Glucosamine Disaccharide) با اسیدهای چرب است که به ساختار غشاء خارجی محکم متصل شده است. فسفات‌ها واحدهای LPS را در کنار هم قرار می‌دهند. یک زنجیره کربوهیدراتی به هر اسکلت دی ساکاریدی متصل می‌شود و به بیرون از باکتری گسترش می‌یابد. پلی ساکارید مرکزی یک پلی ساکارید منشعب حاوی ۹ تا ۱۲ قند است. بیشتر ناحیه مرکزی همچنین برای ساختمان LPS و حیات باکتری ضروری است. بخش مرکزی حاوی یک قند غیرطبیعی به نام ۲- کتو-۳ داکسی- اکتانات ((2-keto-3-deoxy-octanoate (KDO)) است که فسفریله می‌باشد. کاتیون‌های دو ظرفیتی جهت استحکام غشاء خارجی به فسفات‌های LPS و مرکز (Core) متصل می‌شوند. آنتی‌ژن O به بخش مرکزی متصل می‌شود و از باکتری به سمت بیرون گسترش می‌یابد. این آنتی ژن یک آنتی‌ژن پلی‌ساکاریدی طویل و خطی است که از ۵۰ تا ۱۰۰ ساکارید تکرار شونده با ۴ تا ۷ قند در هر واحد، تشکیل شده است. لیپوالیگوساکارید (LOS) که در گونه‌های نایسریا وجود دارد فاقد بخش آنتی ژن O از LPS می‌باشد و به راحتی به خارج از باکتری می‌ریزد. آنتی ژن O کوتاه‌تر در نایسریا باعث می‌شود این باکتری نسبت به کنترل کمپلمان وابسته به میزبان حساس‌تر باشد.

ساختار LPS برای طبقه‌بندی باکتری‌ها به کار می‌رود. ساختار پایه لیپید A در باکتری‌های وابسته یکسان است و برای همه انتروباکتریاسیه‌های گرم منفی مشابه است. بخش مرکزی برای گونه‌های باکتری‌ها یکسان است. آنتی ژن O موجب تمایز سروتیپ‌ها (سویه‌ها) در یک گونه باکتریایی می‌شود. به عنوان مثال سروتیپ O157:H7 (آنتی‌ژن O: فلاژلین) نشان دهنده اشریشیاکلی عامل سندروم اورمی همولیتیک است.

لیپید A و بخش‌های مرکزی در روندی پیوسته در فرایند آنزیمی در سطح داخلی غشاء سیتوپلاسمی ساخته می‌شوند و سپس به خارج از غشاء انتقال می‌یابند. واحدهای تکرای آنتی‌ژن O به ملکول باکتوپرنول (Bactoprenol) متصل می‌شوند، و به خارج از غشاء سیتوپلاسمی انتقال داده می‌شوند و ۵۰ تا ۱۰۰ عدد از این واحدها به صورت پیوسته به زنجیره آنتی‌ژن O در حال رشد متصل می‌شوند.

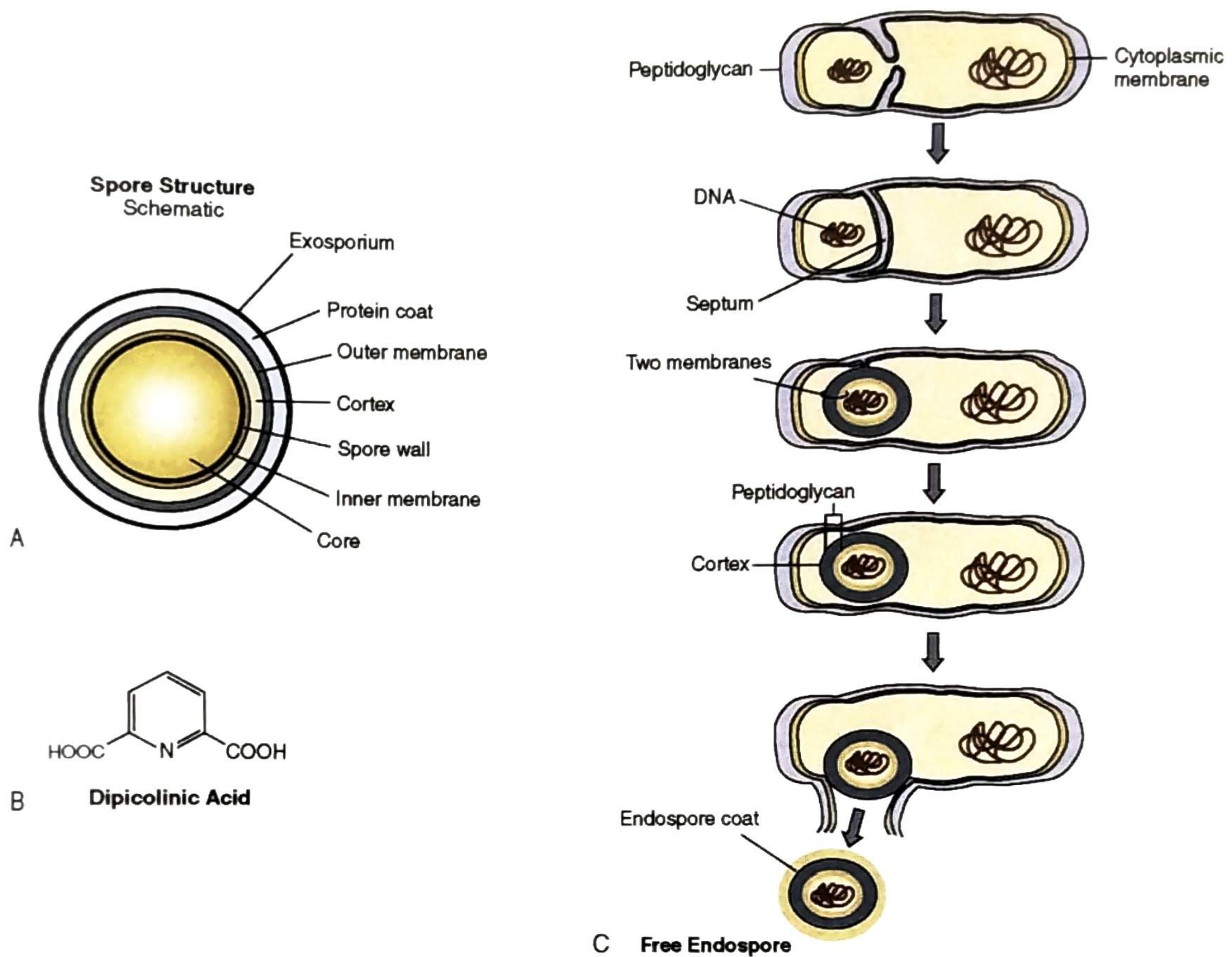


شکل ۱۰-۹. فتومیکروگرافی الکترونی از تقسیم سلولی باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس سوبتلیس*) (سمت چپ) و تقسیم سلولی باکتری‌های گرم منفی (*اشرشیاکلی*) (سمت راست). پیشرفت تقسیم سلولی از بالا به پایین. CM، غشاء سیتوپلاسمی؛ CW، دیواره سلولی؛ N، نوکلئوتید؛ OM، غشاء خارجی؛ S، سپتوم. Bar=0.2 µm

زنجیره آنتی‌ژن O تکمیل شده به ساختار لیپید A مرکزی منتقل می‌گردند. سپس ملکول LPS کامل شده به وسیله گروهی از پروتئین‌ها که یک ساختار Bucket-brigade–like Escalator را تشکیل می‌دهند از غشاء سیتوپلاسمی، از پپتیدوگلیکان، فضای پری پلاسمیک و غشاء خارجی عبور و به سطح خارجی سلول باکتری انتقال داده می‌شود.

تقسیم سلولی

همانندسازی کروموزوم باکتری شروع تقسیم سلولی را نیز راه می‌اندازد (شکل ۱۰-۹). تولید دو باکتری دختری نیازمند رشد و توسعه ترکیبات دیواره سلولی و بدنبال آن تولید سپتوم (دیواره عرضی) جهت تقسیم باکتری های دختری به دو سلول است. سپتوم از دو غشاء سیتوپلاسمایی که توسط دو لایه پپتیدوگلیکان از هم جدا شده‌اند، تشکیل شده است. تشکیل سپتوم در میانه سلول آغاز می‌شود که در این ناحیه مجموعه‌های پروتئینی به یک حلقه رشته ای پروتئینی که در داخل غشاء سیتوپلاسمایی قرار گرفته است، متصل می‌گردند. سپتوم از مکان‌های مقابل هم به سمت مرکز سلول رشد می‌کنند که منجر به شکاف سلول‌های دختری می‌شود. این فرایند به ترانس پپتیدازهای (PBPs) خاص و دیگر آنزیم‌ها نیاز دارد. در استرپتوکوکوس‌ها،



شکل ۱۱-۹. **A**، ساختار یک اسپور **B**، غلظت بالای دی پیکولینیک اسید در اسپور که با کلسیم پیوند می‌یابد و محتویات را تثبیت می‌کند **C**، اسپوروژنز، فرایند تولید اندوسپور.

ناحیه رشد در موقعیت ۱۸۰ درجه از یکدیگر قرار گرفته و زنجیرهای خطی از باکتری‌ها ایجاد می‌کند. بر عکس، نواحی رشد استافیلوکوکوس‌ها در موقعیت ۹۰ درجه قرار دارند. شکسته شدن ناقص سپتوم باعث می‌شود باکتری‌ها به همدیگر متصل باقی بمانند و تشکیل زنجیره (مانند استرپتوکوکوس‌ها) یا خوشه (مانند استافیلوکوکوس‌ها) دهند.

اسپورها

بعضی از باکتری‌های گرم مثبت، اما باکتری‌های گرم منفی هرگز اسپور تولید نمی‌کنند، از قبیل اعضاء جنس باسیلوس (مانند *باسیلوس آنتراسیس*) و کلستریدیوم (مانند *کلستریدیوم تتانی یا کلستریدیوم بوتولینوم*) (باکتری‌های خاک) اسپور تولید می‌کنند. در شرایط نامساعد محیطی مانند از دست رفتن نیازهای غذایی این باکتری‌ها می‌توانند از وضعیت رویشی (Vegetative State) به وضعیت خفته (Dormant State) یا اسپور (Spore) تبدیل شوند. موقعیت قرارگیری اسپور در درون سلول باکتری بعنوان یک خصوصیت آن باکتری مطرح است و می‌تواند در شناسایی باکتری کمک کننده باشد.

اسپور یک ساختار دهیدراته چند لایه است که از باکتری محافظت می‌کند و اجازه بقای باکتری در حالت خفته (Suspended Animation) را می‌دهد (شکل ۱۱-۹). اسپور حاوی یک کپی کامل از کروموزوم، غلظت کمی از

پروتئین‌های ضروری و ریبوزوم، غلظت بالایی از کلسیم متصل شونده به دی پیکولینیک اسید (Calcium Bound to Dipicolinic Acid) است. اسپور یک غشاء داخلی، دو لایه پپتیدوگلیکان (Two Peptidoglycan Layers) و یک پوشش خارجی پروتئینی شبه کراتینی (Outer Keratin-like Protein Coat) دارد. اسپور در زیر میکروسکوپ قابل انکسار (نورانی) به نظر می‌رسد. ساختار اسپور از DNA ژنومی در برابر گرمای شدید، اشعه و اکثر آنزیم‌ها و مواد شیمیایی محافظت می‌کند. در حقیقت اسپورهای باکتریایی به شرایط محیطی بسیار مقاوم است به طوری که می‌تواند برای قرن‌ها بعنوان اسپور زنده باقی بمانند. اسپورها همچنین به سختی توسط مواد ضدعفونی کننده استاندارد یا شرایط اتوکلاو از بین می‌روند.

حذف مواد غذایی خاص (مانند آلانین (Alanine)) از محیط رشد، آبشاری از حوادث ژنتیکی را راه اندازی می‌کند (قابل قیاس با تمایز) که منجر به تولید اسپور می‌شود. mRNA اسپور رونویسی می‌شود و رونویسی از دیگر mRNAها متوقف می‌شود. دی پیکولینیک اسید تولید می‌شود و آنتی بیوتیک‌ها و توکسین‌ها اغلب ترشح می‌شوند. بعد از دو برابر شدن کروموزوم یکی کپی از DNA به همراه محتویات سیتوپلاسمی (هسته) توسط غشاء سیتوپلاسمی، پپتیدوگلیکان و غشاء سپتوم احاطه می‌شوند. این مجموعه که حاوی DNA پوشیده شده با دو لایه غشاء و پپتیدوگلیکان است به طور طبیعی سلول را تقسیم می‌کند. این دو لایه توسط کورتکس (Cortex) احاطه می‌شوند. کورتکس از یک لایه داخلی نازک پپتیدوگلیکان با اتصالات عرضی محکم (Tightly Cross-linked Peptidoglycan) که غشاء سیتوپلاسمی را احاطه می‌کند و یک لایه خارجی پپتیدوگلیکان سست ساخته شده است. کورتکس توسط پوشش سست شبه کراتینی (Keratin-like Protein Coat) محکم احاطه می‌شود که از اسپور محافظت می‌کند. این فرایندها به مدت ۶ تا ۸ ساعت به طول می‌انجامد.

جوانه زدن اسپور (Germination) به حالت رویشی با تخریب پوشش خارجی توسط فشار مکانیکی، pH، گرما یا سایر فشارها در حضور آب و مواد غذایی القا کننده (مانند آلانین (Alanine)) تحریک می‌شود. این فرایند تقریباً ۹۰ دقیقه طول می‌کشد. بعد از شروع فرایند ژرمناسیون، اسپور آب جذب کرده، متورم می‌شود و پوشش‌های خود را از دست می‌دهد و یک سلول رویشی جدید مشابه با سلول رویشی اولیه ایجاد می‌شود و بدین ترتیب تمام چرخه کامل می‌گردد. هنگامی که ژرمناسیون شروع می‌شود، پوشش اسپور تضعیف می‌گردد، اسپور ضعیف شده، آسیب‌پذیر گشته و می‌تواند مانند سایر باکتری‌ها، غیرفعال شود.

سوال‌ها

۱. چگونــه هر کــدام از تفاوت‌های بیــن پروکاریوت و یوکاریوت در درمان و عفونت باکتریایی اثر می‌گذارد؟ (جدول ۱-۹ را ببینید)

۲. چگونه تفــاوت بین دیواره ســلولی باکتری‌های گرم مثبــت و گرم منفی از نظر علایم بالینی شناســایی و درمان روی سلول‌ها اثر می‌گذارد؟

۳. لیســت ترکیبات دیواره ســلولی که با ویرولانس در ارتباط هســتند و موجب حفاظت باکتری در برابر پاسخ ایمنی می‌شود یا موجب حذف پاسخ توکسیک میزبان انسانی می‌شوند را ذکر کنید؟

۴. وقتی ســنتز پپتیدوگلیکان در باکتری‌ها مهار می‌شود چه مکانیســمی باعث مــرگ باکتری می‌شــود؟ اگر چرخه باکتوپرنول توســط پنی‌ســیلین، ونکوماسیین یا باسیتراســین مهار شود چه پیش ســازهایی باید در باکتری تولید شوند؟

۵. چرا اســپور نسبت به اســترس‌های محیطی مقاوم‌تر است؟

۶. آزمایشگاهی می‌خواهد یک باکتری گرم مثبت انتخابی را از مخلوط باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی حذف کند کدام یک از روش‌های زیر بهتر است؟ چرا؟

a) استفاده از اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (یک شلاته کننده کاتیونی دو ظرفیتی)
b) استفاده از دترژنت ملایم
c) استفاده از لیزوزیم
d) استفاده از ترانس پپتیداز
e) اســتفاده از آمپــی ســیلین (آنتی بیوتیــک بتالاکتام هیدروفیل)

پاسخ‌ها

۱. **اندازه:** کوچکتر بودن انــدازه پروکایوت‌ها به آنها اجازه می‌دهد وارد فضاهای کوچکتر شوند. این همچنین این معنی را نیز می‌دهد که سلول ماده ژنتیکی کوچکتری دارد.

ســاختار هسته: نداشتن غشای هســته به کروموزوم اجازه می‌دهد که همانندسازی، رونویســی و ترجمه را همراه با هم انجام دهد. ممانعت از هر کدام از این‌ها با شدت زیادی روی بقیه اثر می‌گذارد.

کروموزوم: کروموزوم باکتری حلقوی است به همین خاطر توپوایزومرازها به خاطر دور کردن آنزیم‌ها (مانند کینولون) هدف‌های عالی برای داروهای ضدباکتری هســتند. از آن جایــی که در باکتری‌ها فقط یک نســخه از هر ژن وجود دارد (ژنــوم هاپلوئید) بنابراین فقط یک جهش، عملکرد را غیرفعــال خواهد کرد زیرا هیچ کپی پشــتیبانی (backup copy) وجود ندارد.

ساختار سیتوپلاسمی: پروکایوت‌ها فاقد اندامک هستند ولی این مســئله اثر قابل توجهی روی عفونــت و درمان آنها ندارد.

ریبوزوم: ریبــوزم 70S (30S+50S) یک هدف عالی برای داروهای ضدباکتریایی اســت زیرا این ریبوزوم با ریبوزوم 80S یوکاریوتی متفاوت است.

غشــای ســلولی: غشــای ســلولی پروکاریــوت حــاوی فســفولیپیدهای متفاوت اســت که آن را به پلی میکسین حساس می‌سازد. غشــای باکتری‌ها همچنین دارای یک پتانســیل غشــایی جهت سنتز ATP و ســایر عملکردها می‌باشد.

دیواره ســلولی: دیواره سلولی باکتری‌ها به صورت پیچیده اســت و محتوی پروتئین، لیپید، و پپتیدوگلیکان اســت. دیواره سلولی به باکتری قدرت لازم برای مقاومت در برابر شوک اسمزی را می‌دهد و به باکتری اجازه زنده ماندن در آب مقطر را می‌دهد. آنزیم‌هایی که این ساختار را می‌سازند بــرای باکتری‌ها منحصر به فرد هســتند، به همین خاطر هدف‌های خوبی برای داروهای ضدباکتریایی هستند (مانند بتالاکتام‌ها، ونکومایسین و باسیتراسین). پیلی برای تقویت اتصال بسیار مهم است. اتصال باعث ابقاء باکتری در بدن (مثلاً در مثانه) می‌شود.

۲. ضخامت دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت شناسایی آن‌ها را از طریق رنگ‌آمیزی گرم تســهیل می‌کند. در باکتری‌های گــرم مثبت رنگ در دیواره ســلولی باقی

پاسخ‌ها (ادامه)

می‌مانـــد. در باکتری‌های گرم منفـــی، پپتیدوگلیکان به صورت یک لایه نازک است و در طی رنگ‌آمیزی، رنگ از دیواره سلولی شسته می‌شود و به رنگ متضاد درمی‌آید. LPS موجود در غشـــای خارجی عامل اصلی فعالسازی ایمنی ذاتی و ایمنی ســـلولی است و می‌تواند باعث القاء تب و سپسیس شود. غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی به صورت یک سد در مقابل کمپلمان، نفوذپذیری ملکول‌های هیدروفوب و بزرگ و همچنین دسترســـی داروهای ضدباکتریایی به پپتیدوگلیکان و ســـاختارهای درونی عمل می‌کند.

۳. حفاظـــت در برابر سیســـتم ایمنی از طریـــق موارد زیر صورت می‌گیرد:

- **پپتیدوگلیکان و آنتی‌ژن O در LPS دسترسی کمپلکس حمله به غشا را به غشاهای سطحی محدود می‌کنند.**
- **کپســـول باکتـــری را در مقابل آنتی‌بـــادی، کمپلمان و فاگوسیتوز محافظت می‌کند.**
- **پروتئین‌هـــا از واکنش‌های خاصی جلوگیری کنند (مثلاً پروتئین A اســـتافیلوکوکوس اورئـــوس به FC در IgG متصل می‌شـــود، پروتئین M در اســـترپتوکوکوس ضد فاگوسیتوز است).**

پاسخ‌های سمی:

- **بخش لیپید A از LPS: دارای فعالیت اندوتوکسینی است و توانایی فعال کردن رســـپتور شـــبه Toll چهار و سایر رسپتورها را دارد.**
- **تیکوئیک اســـید و پپتیدوگلیکان و سایر ترکیبات دیواره ســـلولی فعال کننده‌های ضعیـــف گیرنده‌های الگوی پاتوژن می‌باشند.**

۴. ممانعت کردن از ســـنتز پپتیدوگلیکان از ساخت دیواره سلولی و رشد سلول جلوگیری می‌کند. پپتیدوگلیکان به طور دائم در حال تخریب و دوباره ســـاخته شدن است. جلوگیری از ســـنتز پپتیدوگلیکان باعـــث جلوگیری از پروسه تخریب نمی‌شود. بنابراین در یک سلول در حال رشد تخریب پپتیدوگلیکان ادامه می‌یابد و سلول ضعیف می‌شود و تخریب سلول را تحریک می‌کند.

وقتی سنتز پپتیدوگلیکان توسط بتالاکتام‌ها، ونکومایسین و یـــا باسیتراســـین ممانعت می‌شـــود پنتاپپتید -NAM NAG در سیتوپلاسم ساخته می‌شود زیرا زنجیره طویل نمی‌شود (بتالاکتام‌ها، ونکومایســـین) یا اینکه سیستم انتقالی باکتوپرنول مهار شده است.

۵. اســـپورها مقاوم‌تر هســـتند زیرا آن‌ها رشد نمی‌کنند و به صورت خشـــک هستند و توســـط چندلایه مواد شبه پپتیدوگلیـــکان و پروتئین‌های شـــبه کراتین پوشـــیده شده‌اند.

۶. a. EDTA غشاهای خارجی باکتری‌های گرم منفی را با حذف کاتیون‌های دو ظرفیتی Mg و Ca که فسفات‌های واحدهای LPS را به هم متصل کرده و آنها را با هم نگه می‌دارند، تخریب می‌کند ولی اثر کمی روی باکتری‌های گرم مثبت دارد.

b. دترژنت‌های ملایم بر روی گرم مثبت‌ها اثر بیشـــتری نســـبت به گـــرم منفی‌ها نـــدارد زیرا غشـــای خارجی باکتری‌های گرم منفی از آن محافظت می‌کنند.

c. لیزوزیم، پپتیدوگلیکان دیواره ســـلولی باکتری‌های گرم مثبت را تخریب می‌کنـــد و باعث مرگ باکتری در آب می‌شـــود در صورتی که غشـــای خارجی باکتری‌های گرم منفی مانند یک ســـد از باکتری در مقابل لیزوزیم محافظت می‌کنند.

d. ترانس پپتیداز روی سایر باکتری‌ها اثرگذار نخواهد بود.

e. آمپی‌سیلین از ســـنتز پپتیدوگلیکان هم در باکتری‌های گرم مثبـــت و هم در گرم منفی ممانعـــت می‌کند زیرا می‌تواند از کانال‌های پورینی موجود در غشـــای خارجی باکتری‌های گرم منفی عبور کند.

فصل ۱۰

متابولیسم و ژنتیک باکتریایی

متابولیسم باکتریایی

باکتری‌ها دارای رویکردهای مختلف پیشرفته‌ای برای بدســت آوردن و استفاده از مواد خام ضروری جهت رشد و زنده ماندن در بدن انســان هســتند. تفاوت‌های موجود در نیازهای متابولیــک و فرایندهای آنها و محصولات، امکان افتــراق باکتری‌ها و مشــخص نمودن رفتارهــای آنها در درون بــدن ما و ارائه اهداف برای داروهای ضدمیکروبی را می‌دهد. باکتری‌ها دارای روش‌های پیچیده پیشرفته برای تنظیم رشد خود و کنترل بیان پروتئین و آنزیم در پاسخ به محیط اطراف خود هســتند. این شامل مکانیسم‌هایی برای بیــان فاکتورهای بیماریزای مناســب در داخل بخش‌هایی خــاص در بدن انســان می‌باشــد. آنها همچنیــن دارای روش‌های پیشــرفته برای به اشــتراک گذاشتن دی‌اکسی ریبونوکلئیک اســید (DNA) هستند تا توانایی‌های انتخابی جدید در مواجهه بــا محیط‌ها از جمله وجود آنتی‌بیوتیک‌ها را کسب نمایند.

نیازهای متابولیکی

رشــد باکتریایی نیازمند یک منبع انــرژی و مواد خام جهت ســنتز پروتئین‌ها، ساختارها و غشــاءهایی است که به سلول شــکل می‌دهند و آن را قوی می‌کنند. باکتری‌ها باید جهت ســاختن اسکلت‌های ســلولی، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها را به دست آورده یا سنتز کنند.

حداقل نیازها برای رشــد، یک منبع کربــن، نیتروژن، انرژی، آب و یون‌های مختلف اســت. عناصر ضروری شامل ترکیبات پروتئین‌ها، لیپیدها، نوکلئیک اسیدها (P، S، N، H، O، C)، یون‌های مهم (K، Na، Mg، Ca، Cl) و اجزای آنزیم‌ها (Fe، Zn، Mn، Mo، Se، Co، Cu، Ni) می‌باشد. آهن (Iron) به قدری مهم است که بســیاری از باکتری‌ها پروتئین‌های خاصی (ســیدروفور (Siderophores)) را تشریح می‌کنند تا بتوانند آهن را از محلول‌های رقیق جذب کنند و بدین ترتیب آهن بدن ما کم شــده و سیستم‌های ایمنی ضعیف می‌شود.

اکســیژن (گاز O_2) اگرچه برای حیات انســان بســیار ضروری است اما برای بیشتر باکتری‌ها سمی است. بعضی از باکتری‌ها مانند *کلستریدیوم پرفرنجنس* (که سبب قانقاریای گازی می‌شــود) در حضور اکســیژن نمی توانند رشد کنند. برخی باکتری‌ها به عنوان بی‌هوازی‌های اجباری (Obligate Anaerobes) نامیده می‌شــوند. ارگانسیم‌های دیگر از قبیل *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* که سبب توبرکلوزیس می‌شود برای رشد و متابولیسم به اکسیژن نیاز دارند و تحت عنوان هوازی‌های اجباری (Obligate Aerobes) نامیده می‌شوند. با این وجود، اغلب باکتری‌ها در حضور یا غیاب اکسیژن رشد می‌کنند این باکتری‌ها به عنــوان *بی‌هوازی‌های اختیاری* (Faculative Anaerobes) نامیده می‌شــوند. باکتری‌های هوازی آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکســید دیسموتاز را تولید می‌کننــد که می‌تواننــد رادیکال‌های پراکســید هیدروژن و سوپراکســید که محصولات جانبی و به شــدت ســمی متابولیسم هوازی هستند و توسط نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها تولید می‌شوند تا باکتری‌ها را از بین ببرند را خنثی کنند.

نیازهــای رشــد و محصــولات جانبــی متابولیکی را می‌توان بــه عنوان روش‌های آســان جهــت طبقه‌بندی باکتری‌های مختلف به کار بــرد. بعضی از باکتری‌ها مانند سویه‌های خاصی از *اشریشیاکلی* (عضوی از فلور روده‌ای) می‌تواند همه اســیدهای آمینــه، نوکلئوتیدهــا، لیپیدها و کربوهیدرات‌های ضروری برای رشــد و تقســیم ســلولی را تولید کنــد، در حالی که عامل ســیفلیس یعنی *ترپونما پالیدوم* احتیاجات رشد بسیار پیچیده‌ای دارد و هنوز محیطی که همــه احتیاجات آن‌ها را برای رشــد تأمین کند، وجود ندارد. باکتری‌هایی که می‌توانند از مواد شــیمیایی معدنی